

SÉRIE A N° 3.742

N° D'ORDRE :

4.593

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Christiane BONISSOL née HOMBURG

1^{re} THÈSE. — “ Contribution à l'étude de la toxicité des antibiotiques antifongiques (en particulier la nystatine) pour les cellules animales, cultivées *in vitro* ”.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 26 Juin 1961 devant la Commission d'examen.

MM. A. THOMAS *Président.*

M. JULIA
J. BARRAUD } *Examineurs.*

SÉRIE A N° 3.742

N° D'ORDRE :

4.593

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Christiane BONISSOL née HOMBURG

1^{re} THÈSE. — “ Contribution à l'étude de la toxicité des antibiotiques antifongiques (en particulier la nystatine) pour les cellules animales, cultivées *in vitro* ”.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 26 Juin 1961 devant la Commission d'examen.

MM. A. THOMAS *Président.*

M. JULIA
J. BARRAUD } *Examineurs.*



(Janvier 1961)

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PÈRÈS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	CHAMPETIER	T Chimie Macromoléculaire
DE BROGLIE	T Théories physiques	CUVILLIER	T Micropaléontologie
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées	JUNG	T Pétrographie
PÈRÈS	T Mécanique des fluides et applications	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique
BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique	WIEMANN	T Chimie organique et structure.
PLANTEFOL	T Botanique	JACQUINOT	T Spectroscopie (ORSAY)
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés	VASSY	T Physique de l'Atmosphère
PREVOST	T Chimie organique	DESTOUCHES	T Théories Physiques
BOULIGAND	T Analyse appliquée à la Géométrie	PRUVOST	T Géologie
CHAUDRON	T Chimie appliquée	AMIEL	T Chimie des Solides
WYART	T Minéralogie et Cristallographie	HOCART	T Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T Zoologie	J.P. MATHIEU	T Recherches Physiq.
MANGENOT	T Biologie Vég. (ORSAY)	COUTEAUX	T Biol. Animale (p.c.b.)
AUGER	T Physique quantique et Relativité	MAY	T Zoologie (ORSAY)
MONNIER	T Physiologie des Fonctions	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie
PIVETEAU	T Paléontologie	FELDMANN	T Biologie Végétale (p.c.b.)
ROCARD	T Physique (E.N.S.)	GUINIER	T Physique des Solides (ORSAY)
CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)	JOST	T Physiologie comparée
LAFFITTE	T Chimie Générale	FORTET	T Calcul des Probabilités
FAVARD	T Géométrie supérieure	SCHWARTZ	T Calcul diff. et Intégr.
COULOMB	T Physique du Globe	CHOUARD	T Physiologie Végétale
Mlle COUSIN	T Biologie	MALAVARD	T Aviation (Techn. Aéronaut.)
CHRÉTIEN	T Chimie minérale	BRELOT	T Calcul différentiel
DRACH	T Zoologie	NORMANT	T Synthèse organique générale
KASTLER	T Physique (E.N.S.)	BENARD	T Chimie (E.N.S.C.P.)
EPHRUSSI	T Génétique	BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
RIVIÈRE	T Géologie (ORSAY)	DUGUÉ	T Statistiques Mathématiques
GAUTHERET	T Biologie (p.c.b.)	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
LUCAS R.	T Recherches Phys.	ULRICH	T Physiologie Végétale (E.N.S.)
THOMAS A.	T Biologie cellulaire	MARÉCHAL	T Optique théorique et Appl.
ARNULF	T Optique appliquée	KIRRMANN	T Théories Chimiques
MORAND	T Physique Enseignem.	CHADEFAUD	T Botanique
SOLEILLET	T Physique (p.c.b.)	Mlle LE BRETON	T Physiologie
FORTIER	T Mécan. expérimentale des Fluides	SALEM	T Mathématiques générales
DANJON	T Astronomie	LELONG	T Mathématiques générales
PETIT	T Biologie maritime	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphér.	EHRESMANN	T Topologie Algébrique
GALLIEN	T Embryologie	FRANÇON	T Physique (s.p.c.n.)
EICHHORN	T Biologie Végétale (p.c.b.)	GLANGEAUX	T Géographie physique et Géologie dynamiq.
DE CUGNAC	T Biologie Végétale (s.p.c.n.)	GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)
Mlle CAUCHOIS	T Chimie Physique	PISOT	T Calcul des Probabilités
THELLIER	T Physique du Globe	ROCH	T Géologie
L'HÉRITIER	T Biologie Générale (ORSAY)	SCHATZMAN	T Astrophysique
GRIVET	T Radioélectricité (ORSAY)	TERMIER	T Paléontologie stratigraphique
PONCIN	T Mécanique Générale	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des Nombres		
QUELET	T Chimie Organique		
CAGNIARD	T Géophysique appliquée		

LENNUIER	T Physique (P.C.B.)	FRIEDEL	Physique des Solides (ORSAY)
RIZET	T Génétique (ORSAY)	M. JULIA	Chimie Organ. Structurale
ROUTHIER	T Géologie appliquée	LENDER	Biologie Animale (S.P.C.N.) (ORSAY)
Mme TONNELAT	T Relativité	MAGAT	Physico-chimie des rayonnements
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.)	Mlle QUINTIN	T Electrochimie
SOUCHAY	T Chimie (P.C.B.)	MONOD	T Biochimie Cellulaire
AIGRAIN	T Electrotechnique générale	BERNOIT	T Physiol. Anim. (ORSAY)
FRUSSET	T Chimie minérale	DE POSSEL	T Analyse numérique
M. LÉVY	T Physique théorique des hautes Energies (ORSAY)	CHARLOT	T Chimie analytique
Mme CHAIX	T Chimie biologique	HAISSINSKY	T Radiochimie
Mme HUREL-PY	T Biologie Végétale (P.C.B.)	LEMÉE	T Physiol. B.M.P.V. (ORSAY)
PIAUX	T Chimie (S.P.C.N.)	GUÉRIN	T Chimie (ORSAY)
BRUN	T Mécan. expérimentale des fluides	CHATELET M.	Chimie (P.C.B.)
LEDERER	T Chimie biologique	JEAN	Physique (ORSAY)
Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agrégé).	MATTLER	T Physique (ORSAY)
Mme LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)	MICHEL Louis	Physique théor. (ORSAY)
BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)	RUMPF	Chimie (P.C.B.)
COTTE	T Physique (M.P.C.)	BERGERARD	Biol. Anim. (S.P.C.N.) (ORSAY)
DUBOIS J.E.	T Chimie (M.P.C.)	BERTEIN	Electronique (ORSAY)
LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.)	BOUSSIÈRES	Chimie des Radioéléments (ORSAY)
MICHEL André	T Chimie Minérale (ORSAY)	Mme COUTURE	Thermodynamique et Mécanique Physique
OLMER	T Energétique générale	ELLENBERGER	Géologie appliquée
ROUAULT	T Physique	FRANC	Biol. Animale (P.C.B.)
GAUTHIER	T Mécanique appliquée	SCHNELL	Botanique tropicale (ORSAY)
BARCHIEWITZ	T Chimie Physique	STOLKOWSKI	Biol. Animale (P.C.B.)
BROSSEL	T Physique atomique	ACHER	Chimie Biol. (ORSAY)
BUSER	T Biologie animale (P.C.B.)	BAUDIN	Biologie
CAMUS	Biologie végétale (P.C.B.)	BEAUMONT	Biologie animale
CASTAING	T Physique (ORSAY)	BLAMONT	Géophysique Ionosphère
CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie	BOURREAU	Biologie Végétale (S.P.C.N.) (ORSAY)
MOYSE	T Physiologie végét. (ORSAY)	CURIE D.	Physique (M.G.P.)
PANNETIER	T Chimie (ORSAY)	DURAND-DELGA	Géologie
POSSOMPES	T Biologie Animale (P.C.B.)	FRÉON	Chimie Organique (ORSAY)
PULLMANN	Chimie théorique	HELLER	Physiologie végétale
TEILLAC	T Physique Nucléaire et Radioactivité (ORSAY)	TORTRAT	Calcul des Probabilités
TONNELAT	Biologie physico-chim.	CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.)
VILLE	T Econométrie	MAGNAN	T Physique (P.C.B.)
WILLEMART	Chimie (P.C.B.)	DAUDEL	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire
DODE	T Chimie (ORSAY)	Mlle FOURCROY	Biologie Végétale (S.P.C.N.)
FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.)	BARRAUD	Physiologie Cellulaire.
GUINOCHET	T Biologie Vég. (ORSAY)	NOIROT	Evolution des êtres organisés
ROLLET	T Chimie (P.C.B.)	Mme FOURES-BRUHAT	T Mécan. Analytique et Mécanique céleste
Mlle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.)	Mlle VEIL	Physiologie Générale
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes	LWOFF	T Microbiologie
ARNOULT	T Electronique (ORSAY)	SIESTRUNCK	T Mécanique physique et expérimentale
CHAPELLE	T Physique (ORSAY)	LACOMBE	T Métallurgie (ORSAY)
DELANGE	T Mathématiques (ORSAY)	BROCHARD	T Physique P.C.B. (ORSAY)
DENY	T Mathématiques Générales (ORSAY)	CABANNES	T Mécanique générale
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides	LESIEUR	T Mathématiques M.P.C. (ORSAY)
LUCAS G.	T Géologie	MAZET	T Mécanique générale (ORSAY)
ALLARD	T Chimie Physique		
BERTHELOT	T Physique Fondamentale des Hautes Energies (ORSAY)		
BRICARD	T Météorologie		
Mme ALBE-FESSARD	Psychophysiologie		
		Secrétaire Général.....	R. POUILLAIN

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TOXICITÉ
DES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES
(EN PARTICULIER LA NYSTATINE)
POUR LES CELLULES ANIMALES CULTIVÉES
“ *in vitro* ”

A Monsieur le Professeur Pierre LÉPINE,
qui a bien voulu s'intéresser à nos recherches et nous permettre
de réaliser notre travail, en témoignage de notre respectueuse
et profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J. André THOMAS,
qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse,
en remerciement respectueux pour les conseils qu'il a bien voulu
nous donner.

A la mémoire de Monsieur le Professeur Geoffrey Wm RAKE,
qui a guidé nos premiers essais.

A Monsieur le Professeur J. BARRAUD,

A Monsieur le Professeur M. JULIA,
qui ont accepté de faire partie de notre jury, avec toute notre
reconnaissance.

A Mademoiselle P. KONA,
qui nous a apporté un concours précieux, l'assurance de notre
gratitude et de notre attachement.

A Monsieur le Docteur L. DELSAL,
en remerciement pour les conseils qu'il nous a si souvent prodigués.

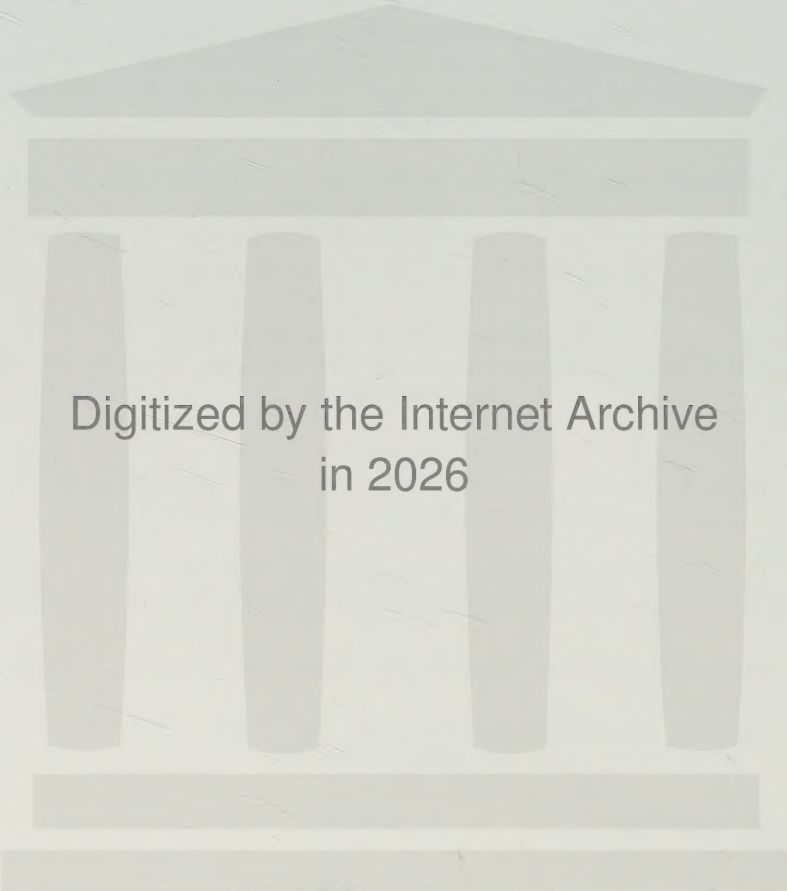
A tous nos amis du Service des Virus de l'Institut Pasteur,
Au Service de microphotographie de l'Institut Pasteur pour
son aide si efficace.

A mes parents.

A mon mari

A mes amis

A mes fils



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Les progrès rapides des méthodes de cultures cellulaires ont été dûs en partie à l'utilisation des antibiotiques : ceux-ci- ajoutés aux milieux de culture, permettent de maintenir très simplement des conditions stériles pour le travail courant.

Des études sur la cytotoxicité de la pénicilline [Herrel et Heilman (38)] et de la streptomycine [Heilman (35)] ont confirmé la faible toxicité de ces antibiotiques à l'égard des cellules. Tous deux sont utilisés couramment et assurent une assez bonne protection contre la contamination bactérienne.

Une protection semblable contre l'action des champignons demeure souhaitable et même nécessaire, car pour diagnostiquer les maladies à virus il faut réaliser des isollements à partir de prélèvements parfois contaminés par des levures ou par des champignons filamenteux.

Nous avons donc recherché quels seraient, parmi les antifongiques, les produits les meilleurs en vue d'une utilisation générale dans la culture de tissus.

Les produits ont été choisis d'après leur spectre. Aussi des antibiotiques comme l'actidione (40), la clavacine et l'actinomycine (40) qui ne sont actifs, le premier qu'à l'égard des levures, le second qu'à l'égard des moisissures, le troisième qu'à l'égard d'un nombre restreint de champignons, n'ont pas été retenus comme sujets d'étude.

D'autre part en raison du fait que l'activité antifongique doit être maintenue à un pH voisin de la neutralité, - condition nécessaire à la culture des cellules -, la viridine [Brian (6)] qui n'est active qu'à un pH très acide n'a pu être utilisée.

Enfin un produit ne peut convenir que s'il ne possède aucune action toxique sur les cellules anima-

les. Nous avons donc déterminé en premier lieu la toxicité des doses ; car, si le mode d'action antifongique a été étudié dans de nombreux cas, celui de l'action toxique sur les cellules ne l'a pas encore été.

Ainsi, l'actidione inhibe-t-elle la respiration du mycélium [Walker et Smith (77)]. La griséofulvine agit sur les membranes des champignons et produit des distorsions [Brian (7)]. La nystatine s'oppose à l'utilisation du glucose par les levures et inhibe leur respiration [Lambert et coll. (46)]. L'amphotéricine B stimule les oxydations cellulaires en créant un déséquilibre métabolique fatal aux levures [Drouhet et coll. (17)].

Mais on ne connaît pas leur mode d'action sur les tissus animaux, sauf en ce qui concerne les signes cliniques observés chez les malades, traités par ces agents antifongiques, et chez les animaux utilisés pour les tests sur leur toxicité.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier la toxicité de ces produits à l'égard des cellules animales et de déterminer les relations entre une activité biologique sur des cellules animales et une activité semblable sur des champignons au niveau cellulaire.

I - MATERIEL ET METHODES

Au cours de nos recherches, nous avons été amenés à utiliser un certain nombre de techniques qui peuvent être ainsi résumées :

1. CULTURES CELLULAIRES :

Les cellules animales employées ont été de trois sortes :

a) Cellules de lignée "HeLa", isolées par Gey (26) à partir d'un cancer humain du cervix.

b) Cellules de lignée "L", établies par Earle (23) provenant d'une seule cellule d'un fibro-sarcome de souris.

c) Cellules embryonnaires de poulet.

Les souches stables de cellule ont été maintenues dans notre laboratoire selon la méthode de Scherer et coll. (69).

Une suspension fraîche de cellules d'embryons de poulet, "C.E.P.", a été préparée pour chaque expérience selon la méthode de Dulbecco et Vogt (19).

Le milieu semi-synthétique à l'hydrolysate de caséine de Lépine et coll. (49), additionné de 10 % de sérum de poulain, de 200 unités et 150 mcg de pénicilline et de dihydrostreptomycine respectivement par ml, a été utilisé pendant toutes les expériences, sauf dans certains cas qui seront indiqués chaque fois.

L'incubation des cellules a été toujours réalisée à la température de 37° C. Le pH des surnageants varia de pH 6,8 à 7,8.

2. PRODUITS ANTIFONGIQUES :

Les produits antifongiques nous ont été fournis par différentes maisons. Le produit du même lot a été

utilisé autant que possible pendant toute la durée de l'expérience. Plusieurs produits ne purent être utilisés en raison de leur insolubilité, de la pauvreté du spectre antifongique, de leur instabilité aux valeurs d'un pH avoisinant la neutralité ou de leur inactivation par le sérum.

Chaque produit a été stérilisé, avant utilisation, par filtration ou à l'autoclave.

3. FONGI :

Deux moisissures et une levure (*Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae*) ont été choisies comme organismes contaminants. Ces champignons furent cultivés dans des bouteilles d'agar de Sabouraud. Les spores récoltées dans de la solution saline de Earle (23) ont été comptées dans un hémocytomètre.

4. TITRAGE DES AGENTS ANTIFONGIQUES :

Pour doser les antibiotiques, on ne peut recourir qu'à des mesures de leur activité biologique.

L'évaluation des produits antifongiques a donc été fondée sur les résultats de titrages en bloc mettant en présence des concentrations variables de divers champignons, une suspension constante de cellules et des concentrations variables du produit mis à l'essai.

Pour les antibiotiques, des dilutions (1:2) ont été préparées dans la solution saline, la concentration finale du produit dans les tubes variant de 0,4 à 4000 mcg par ml de milieu.

Les dilutions de spores (1:10) ont été préparées, - la concentration finale des spores dans les tubes variant de 10 à 1 000 000 par ml de milieu utilisé.

0,1 ml de chaque dilution du produit étudié a été placé dans des tubes marqués. 2 ml de la suspension de cellules (contenant 50 000 par ml) ont été introduits à l'aide d'une pipette automatique, puis 0,1 ml de

chaque dilution de fongi ajouté.

Finalement les tubes ont été bouchés et incubés à 37° C en position inclinée.

Les cellules se sont multipliées sur la partie immergée de la paroi du tube. Après sept jours, le milieu est devenu acide et les cellules ne se multiplient presque plus. Dans le cas de cellules d'embryons de poulet, on a souvent constaté un début de dégénération. Pour vérifier la stabilité du produit dans son action contre les champignons, les tubes ont été maintenus pendant deux autres semaines à la température ordinaire.

Le degré de croissance des cellules et des fongi a été relevé après trois jours puis à une, deux et trois semaines d'intervalle.

Les levures sont en raison de leur petite taille difficiles à déceler, surtout aux concentrations critiques. A chaque lecture, 0,2 ml du milieu de chaque tube a été incubé à la surface d'une boîte de Pétri contenant une couche d'agar de Sabouraud.

5. ETUDE A L'APPAREIL DE WARBURG :

Dans l'espoir d'obtenir des valeurs plus précises de la respiration cellulaire, nous avons employé des microcupules permettant de placer un volume maximum de 1,5 ml de milieu.

A leur centre se trouve le puits dans lequel nous avons introduit 0,2 ml d'une solution de potasse à 15 %. Pour augmenter la surface d'absorption du gaz carbonique, nous y avons trempé de petits morceaux de papier filtre.

Mais le système étant constamment secoué à la fréquence de 60 fois par minute, avec une amplitude de 2,5 cm., nous n'avons utilisé qu'un volume total de 1 ml pour éviter un mélange avec la potasse.

Les cellules d'une même boîte de Roux ont été lavées avec une solution saline ne contenant ni calcium, ni magnésium, puis traitées avec le versénate de sodium

selon la méthode indiquée par Anderson (1). Le versène a une action moins brutale sur les cellules que la trypsine et nul retard dans la consommation d'oxygène n'a été constaté. La moyenne des cellules ensemencées a été de $0,5 \times 10^6$

Le milieu utilisé a été le même que celui qui a été indiqué ci-dessus avec la seule différence que le bicarbonate a été remplacé par une solution de Tris (hydroxyméthylaminouréthane), ajustée à pH 7,4 par de l'acide chlorhydrique (0,1 N), à la concentration finale de 0,02 M. L'emploi du Tris a pour but d'éliminer des erreurs de volume dues à la décomposition du bicarbonate du milieu.

Chaque microcupule est muni d'un coude où a été introduite séparément la suspension de nystatine dans un volume de 0,3 ml. Celle-ci a été alors mélangée à un moment déterminé de l'expérience à la suspension cellulaire.

Une pièce intermédiaire portant un disque stérile de papier à antibiotiques permet de rattacher la cupule au manomètre tout en conservant stérile l'intérieur de la cupule.

Tous les joints ont été lubrifiés avec de la graisse aux silicones, stérilisée vingt minutes à la cocotte-minute sous pression de 1 kg. 5.

Après montage des différents systèmes (cupule. manomètre) on a placé les cupules dans un bain-marie constant à la température de 37°C. , et mis en marche l'agitation. Les manomètres n'ont été fermés qu'au bout de trente minutes, ce qui permet de réaliser un bon équilibre des températures dans les systèmes. On a placé chacun de ceux-ci sous pression légère de façon à permettre la détection immédiate de toute fuite. Lorsque tous les manomètres (sauf les témoins qui ne contiennent que du milieu sans cellules) indiquent une respiration sensiblement égale des cellules, le contenu des coudes a été versé dans la cupule et le système remis en place.

Dans les expériences qui ont dépassé vingt-quatre heures, il a été nécessaire de rajuster les manomètres

au zéro. En effet, il devient impossible à ce moment de lire les variations, puisque le liquide de Brodie se trouve au-delà de l'échelle graduée.

Les résultats ont été traduits en microlitres d'oxygène par ml. de milieu et par demi-million de cellules.

Une erreur de 10 % est possible par suite de l'imprécision des mesures avec les pipettes, de la variation de volume d'un système à l'autre, due à la taille des disques et des morceaux de papier, ainsi que du manque d'uniformité de la suspension cellulaire.

6. ETUDE DES CELLULES AU MICROSCOPE :

L'étude des cellules au microscope peut se faire à condition d'avoir une couche monocellulaire fixée sur une surface plane.

Nous avons donc employé dans ce but les tubes de Leighton J. dont une face aplatie est recouverte d'une lamelle et permet une observation directe au microscope.

Les tubes ont été ensemencés avec la même suspension cellulaire à raison de 100 000 cellules dans 2 ml de milieu.

Si une méthode histologique ou histochimique a été employée, les cellules ont d'abord été lavées à l'eau physiologique, puis placées sur un support en porcelaine spécialement construit pour porter 12 lamelles.

A partir de ce moment, les cellules des tubes-témoins et les cellules étudiées ont été traitées de façon identique, des variations de coloration des cellules-témoins et des autres cellules ne pouvant être attribuées à une différence de technique.

II - ACTIVITE ET TOXICITE DES PRODUITS ANTIFONGIQUES

Nous avons évalué l'activité et la toxicité des produits antifongiques par la méthode de titrage en bloc ci-dessus indiquée. (Cf. Chapitre I n° 4).

Les expériences ont permis d'évaluer chaque produit au point de vue de ses propriétés de solubilité, de stabilité, de toxicité pour les cellules et d'activité à l'égard des champignons.

A - DEFINITION DE L'ACTIVITE ET DE LA TOXICITE

Le point critique d'activité est défini comme correspondant à la concentration la plus faible du produit à laquelle la croissance d'un inoculat choisi de spores est entièrement arrêtée

Le point critique de toxicité est défini comme correspondant à la concentration la plus faible du produit à laquelle un effet toxique sur les cellules peut être décelé.

Moins le produit est toxique, plus la valeur de la concentration critique de toxicité est grande ; plus le produit est actif, plus la concentration du point critique d'activité est faible. Il s'ensuit que lorsqu'on calcule de rapport des concentrations critiques activité/toxicité, plus le rapport est grand et plus la marge de sécurité pour utilisation du produit est elle-même grande, et meilleur est le produit

B - VALEUR COMPAREE DES DIFFERENTS PRODUITS

Le tableau 1 indique la valeur de ces rapports tels qu'ils ont été déterminés pour chaque produit en utilisant un inoculat constant de 1000 spores par ml de milieu. Il est évident qu'aucun des produits synthétiques n'est satisfaisant. Ces produits sont en général très toxiques à l'égard des cellules ou peu stables.

VALEUR DES PRODUITS ANTIFONGIQUES DET

Produits antifongiques	Types de cellules	Fongi	Activité / toxicité après			
			3 jours	7 jours	2 semaines	3 semaines
NYSTATINE (1)	"L"	A. niger	16	4,2	2	1
	"L"	P. notatum	16	8	1	-
	"L"	S. cerevisiae		16	16	
	"HeLa"	A. niger		4		1
	"HeLa"	P. notatum		8		1
	"HeLa"	S. cerevisiae		16	8	
	"C.E.P."	A. niger		16	4	
	"C.E.P."	P. notatum		8	2	
	"C.E.P."	S. cerevisiae		16	8	
PLEOCIDINE (2)	"L"	A. niger	8	2	2	2
	"L"	S. cerevisiae	16	8	8	8
	"HeLa"	A. niger	16	4	2	1
AMPHOTERICINE B (1)	"L"	A. niger	8	4	4	4
	"L"	P. notatum	4	2	0,5	0,5
	"L"	S. cerevisiae	8	8	8	8
	"HeLa"	A. niger	8	8	8	8
AMPHOTERICINE A (1)	"L"	A. niger	32	32	8	8
	"L"	P. notatum	16	16	4	4
	"L"	S. cerevisiae	16	16	8	8
	"HeLa"	A. niger	16	8	8	8
	"HeLa"	P. notatum	16	8	8	4
	"HeLa"	S. cerevisiae	32	32	16	16
	"C.E.P."	A. niger	32	9	4	4
	"C.E.P."	P. notatum	32	2	1	1
	"C.E.P."	S. cerevisiae	16	8	8	8
L-6 (3)	"L"	A. niger	0.125	0.062		
	"HeLa"	S. cerevisiae	2	0,5	0,5	0,25
DITHANE D 14 (6)	"C.E.P."	A. niger	0,07	0,07		
	"C.E.P."	S. cerevisiae	4	1		
DITHANE A 10 (6)	"C.E.P."	A. niger	0,07	0,016		
	"C.E.P."	S. cerevisiae	4	0,25		
ACIDE SORBIQUE (7)	"HeLa"	A. niger	1	< 1		

() produits de la compagnie : 1. E.R. Squibb & Sons - 2. Sharpe et Dohme, Division
4. Upjohn - 5. Fischer Scientific - 6. Rohm et Haas

ERMINEE PAR LE RAPPORT ACTIVITE/TOXICITE

Produits antifongiques	Types de cellules	Fongi	Activité / toxicité après			
			3 jours	7 jours	2 semaines	3 semaines
GRISEOFULVINE (2)	"HeLa" "HeLa"	A. niger	0,06	0,06		
		S. cerevisiae	0,125	0,06		
FUNGICHRIMINE (2)	"HeLa" "HeLa"	P. notatum	1	0,25		
		S. cerevisiae	1	1		
EULICINE (2)	"HeLa"	A. niger	260	260	32	16
	"HeLa"	P. notatum	32	8	0,2	-
	"HeLa"	S. cerevisiae	64	8	8	8
	"L"	A. niger	260	130	130	130
	"L"	P. notatum	64	4	0,2	
	"L"	S. cerevisiae	31,3	31,3	31,3	4
	"C.E.P."	A. niger	520	260	130	130
	"C.E.P."	P. notatum	32	2	0,1	0,1
ACIDE UNDECYLENIQUE (5)	"HeLa"	A. niger	0,5	1	0,5	
PROPIONATE DE SODIUM (5)	"HeLa"	A. niger	0,25	0,25	0,25	
FILIPINE (4)	"HeLa"	A. niger	1	0,25		
	"HeLa"	S. cerevisiae	31,25	31,25		
HYAMINE 1622 (6)	"C.E.P."	A. niger	0,25	0,032		
	"C.E.P."	S. cerevisiae	32,5	1		
HYAMINE 3104 (6)	"C.E.P."	A. niger	0,06	0,004		
	"C.E.P."	S. cerevisiae	15,6	0,016		
HYAMINE 2389	"C.E.P."	A. niger	1	0,032		
	"C.E.P."	S. cerevisiae	32,5	0,25		
PRIMENE J.M. (6)	"C.E.P."	P. notatum	15,6	15,6	0,06	
	"C.E.P."	S. cerevisiae	15,6	15,6	0,25	
KARATHANE (6)	"C.E.P."	P. notatum	1000	< 1	< 1	
	"C.E.P."	S. cerevisiae	1000	1	1	

Parmi les antibiotiques, quatre peuvent être utilisés en culture de tissus : la nystatine, la pléocidine, les amphotéricines (A et B), l'eulicine.

1) Le produit nystatine (33) provient de la culture de *Streptomyces noursei*. C'est une poudre jaune, cristalline, appartenant au groupe des polyènes, très peu soluble dans l'eau (dans les proportions limites de 120 à 240 mcg par ml).

Sa molécule non saturée de tétraène conjugué explique son instabilité en solution. Les divers solvants organiques de la nystatine ne peuvent être utilisés à cause de leur propre toxicité pour les cellules (alcool éthylique, diméthylacétamide, diméthylsulfoxyde). En effet, si l'on dilue les solvants dans le milieu de culture, la nystatine reprécipite.

Nous avons donc utilisé la poudre stérile en suspension dans l'eau distillée. Le contenu de chaque flacon, après addition d'eau stérile, a été réparti dans des ampoules, lesquelles ont été ensuite scellées et conservées à - 20°C. Une ampoule dégelée a été utilisée le jour même et n'a jamais été conservée ; mais à la température de 4°C, les suspensions aqueuses demeurent stables pendant deux semaines.

Comme l'indique le tableau 2, la nystatine atteint le point critique de toxicité à la concentration de 100 mcg par ml (*) de milieu.

Le tableau 3 fait ressortir clairement la diminution d'activité après une semaine d'incubation. Les spores commencent alors à se développer, révélant l'action fongistatique de cet agent.

Une contamination par l'introduction de 1000 spores par ml est empêchée par la présence de 20 mcg par ml pendant une semaine.

On peut donc utiliser une concentration de 25 mcg de nystatine par ml de milieu (soit environ 60 unités) et l'on devra changer le milieu chaque semaine.

(*) Ces expériences ont été faites avec le même lot. Chaque nouveau lot a été retiré ; car nous avons remarqué que si le point critique d'activité se manifeste sensiblement vers la même valeur, la dose critique de toxicité pour les cellules peut varier de 100 à 500 mcg par ml.

T A B L E A U 2

**CONCENTRATION CRITIQUE DE TOXICITE DES PRODUITS
ANTIFONGIQUES ENVERS 3 TYPES DE CELLULES ANIMALES**

Produits	Cellules	Concentration minima de toxicité en mcg par ml			
		3 jours	1 semaine	2 semaines	3 semaines
Nystatine	"L"	120	120	120	120
	"HeLa"	120	100	100	100
	"C.E.P."*		100	100	
Pleocidine	"L"	100	75	75	75
	"HeLa"	200	100	100	100
Amphotéricine A	"L"	200	200	130	130
	"HeLa"	200	200	200	200
	"C.E.P." *	170	100	100	100
Eulicine	"L"	80	65	65	37,5
	"HeLa"	100	65	65	50
	"C.E.P."*	200	166	50	50

* Cellules embryonnaires de poulet



TABLEAU 3

ACTIVITE DE LA NYSTATINE ENVERS 3 TYPES DE FONGI
EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION

Fongi	Nombre de spores par ml de milieu	Concentration minima d'inhibition en mcg par ml			
		3 jours	1 semaine	2 semaines	3 semaines
<i>Aspergillus niger</i>	10	6,25	12,5	25	25
	10^2	6,25	14,4	50	50
	10^3	12,5	20,8	50	100
	10^4	12,5	38	166,4	200
	10^5	12,5	62,4	183,2	250
	10^6	50	112	200	400
<i>Penicillium notatum</i>	10		3,25	75	100
	10^2		9,36	100	100
	10^3		16,4	100	100
	10^4		58,4	100	400
	10^5		200	200	400
	10^6		250	300	400
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10		6,25	6,25	6,25
	10^2		6,25	9,36	12,5
	10^3		10,4	41,6	
	10^4		16,4	41,6	
	10^5		41,6	68,4	
	10^6		232	232	

2) La pléocidine (12) est dérivée de cultures de *Streptomyces lavendulae*. Sa solubilité est excellente et ses solutions aqueuses sont très stables.

Le tableau 2 indique une concentration toxique pour les cellules de 75 mcg par ml.

Son action est très spécifique et fongicide envers les levures : 10 000 spores ne peuvent se développer en présence de 6,25 mcg/ml (voir tableau 4) Mais 50 mcg étant nécessaires pour arrêter la croissance de 100 spores de moisissure, la marge de sécurité d'utilisation est faible. Il semble donc que la pléocidine devrait être employée seulement dans le cas de contamination par des levures à la concentration de 7 mcg par ml de milieu.

3) Les amphotéricines A et B (27) sont également préparées à partir d'une variété de *Streptomyces*. Ce sont des systèmes tétraéniques conjugués, insolubles dans l'eau. Leur poudre sèche conservée à 5°C est stable pendant une période indéfinie. Pour stériliser cette poudre par filtration, il fut nécessaire de la dissoudre d'abord dans le diméthylacétamide. La stabilité de la suspension en milieu de culture à 37°C est bonne.

D'après le tableau 1, l'amphotéricine A possède un indice supérieur à celui de l'amphotéricine B. Ceci est dû à la meilleure solubilité de l'amphotéricine A, que l'on peut utiliser à de plus fortes concentrations sans être gêné par la toxicité du solvant.

Le tableau 5 fait ressortir que l'amphotéricine A a un effet fongicide sur les spores. Son activité demeure moindre à l'égard du *Penicillium*.

Se fondant sur le fait que 37 mcg/ml empêchent la croissance d'un inoculat de 100 spores, on peut considérer comme indiquée l'utilisation de 40 mcg d'amphotéricine A par ml.

4) L'eulicine (11) a été isolée à partir de cultures de *Streptomyces parvus* et préparée comme un sel neutre. Ce produit est très soluble dans l'eau. La poudre sèche est hygroscopique ; mais, en solution, l'eulicine se conserve à -70°C indéfiniment.

TABLEAU 4

ACTIVITE DE LA PLECCIDINE ENVERS 3 ESPECES DE FONGI
EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION

Fongi	Nombre de spores par ml de milieu	Concentration minima d'inhibition en mcg par ml de milieu			
		3 jours	1 semaine	2 semaines	3 semaines
Aspergillus niger	10	6,25	15	25	25
	10 ²	12,5	25	50	50
	10 ³	12,5	37,5	50	83
	10 ⁴	50	50	100	130
	10 ⁵	75	100	300	300
	10 ⁶	75	160	200	350
Saccharomyces	10	6,25	6,25	6,25	6,25
	10 ²	6,25	6,25	6,25	6,25
	10 ³	6,25	6,25	6,25	6,25
	10 ⁴	3,25	6,25	6,25	6,25
	10 ⁵	12,5	12,5	12,5	12,5
	10 ⁶	25	25	25	25

. T A B L E A U . 5

ACTIVITE DE L'AMPROTERICINE "A" ENVERS 3 ESPECES DE
FONGI EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION

Fongi	Nombre de spores par ml de milieu	Concentration minima d'inhibition en mcg par ml			
		3 jours	1 semaine	2 semaines	3 semaines
Aspergillus niger	10	12,5	12,5	12,5	12,5
	10 ²	12,5	12,5	20	25
	10 ³	12,5	16	25	25
	10 ⁴	23	25	33	75
	10 ⁵	29	50	75	100
	10 ⁶	29	50	75	100
Penicillium notatum	10	6,25	8	16	16
	10 ²	6,25	12	37	37
	10 ³	10	37	75	75
	10 ⁴	16	50	50	80
	10 ⁵	50	50	100	200
	10 ⁶	100	100	200	300
Saccharomyces cerevisiae	10	6,25	6,25	6,25	6,25
	10 ²	6,25	6,25	6,25	6,25
	10 ³	6,25	8	12,5	12,5
	10 ⁴	8	12,5	12,5	12,5
	10 ⁵	37	30	20,8	29
	10 ⁶	42	42	42	58

TABLEAU 6

ACTIVITE DE L'EULICINE ENVERS 3 ESPECES DE FONGI
EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION

Fongi	Nombre de spores par ml de milieu	Concentration minima d'inhibition en mcg par ml			
		3 jours	1 semaine	2 semaines	3 semaines
<i>Aspergillus niger</i>	10	0,4	0,4	0,4	0,4
	10 ²	0,4	0,4	0,4	0,4
	10 ³	0,4	0,4	0,4	0,4
	10 ⁴	0,7	0,7	1	2,6
	10 ⁵	2,3	3	6	8
	10 ⁶	9,5	20,5	30	41
<i>Penicillium notatum</i>	10	0,4	1,5	6	25
	10 ²	0,4	11	83	400
	10 ³	3	45	400	400
	10 ⁴	43	285	400	400
	10 ⁵	108	400	400	400
	10 ⁶	600	400	400	400
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	1,5	1,5	3	3
	10 ²	1,5	1,5	5	5
	10 ³	9,3	10	19	21
	10 ⁴	18,6	18,6	43	69
	10 ⁵	50	68	75	75
	10 ⁶	200	200	200	200

On constate (voir tableau 2) que ce produit est plus toxique que les autres antibiotiques, la concentration critique étant de 50 mcg par ml.

L'examen du tableau 6 révèle une remarquable spécificité d'action sur l'*Aspergillus*. M.K. West et coll. (41) ont démontré que c'était le cas pour la plupart des champignons filamenteux. Le *Penicillium* détériore spécifiquement le produit. Une concentration plus grande d'eulicine est nécessaire pour prévenir une contamination par des levures. 10 mcg par ml arrêtent la croissance de 100 spores. Il semble donc que 10 mcg par ml de milieu (c'est-à-dire 6 unités) soient à recommander en matière d'utilisation courante.

Par ses propriétés de solubilité, de stabilité et par la valeur du rapport activité/toxicité, l'eulicine paraissait constituer l'agent antifongique le plus efficace.

Mais la culture prolongée des cellules en sa présence à la dose de 10 mcg/ml a fait apparaître vers la troisième semaine un effet toxique irréversible. On ne saurait donc utiliser l'eulicine de façon routinière.

C - CONCLUSION

Les tableaux d'activité (3, 4, 5 et 6) montrent que le pouvoir d'inhibition sur la croissance des champignons varie en fonction de l'espèce fongique utilisée, la nystatine et la pléocidine étant plus actives sur les levures, l'eulicine étant surtout active sur les champignons filamenteux.

Mais cette activité étant constante pour une concentration donnée d'un champignon donné, nous avons titré les lots d'antibiotique utilisés ultérieurement en ne tenant compte que de leur action inhibitrice sur les dilutions d'*Aspergillus niger*.

D'autre part, le tableau de toxicité n° 2 dont les valeurs concordent avec celles trouvées par Hemphill (34) montre que, pour un antibiotique donné, la concen-

tration minimale provoquant un effet toxique sur les cellules est sensiblement la même quelles que soient les souches de cellules utilisées. Nous avons donc limité nos expériences à la seule lignée stable des cellules "HeLa", la plus connue des souches dans les laboratoires de culture de tissus.

Ainsi les amphotéricines et la nystatine demeurent-ils les meilleurs antibiotiques. De plus, la nystatine d'après Mc Limans et coll. (54) n'interfère pas avec les infections virales et, employée à une dose sous-toxique, n'a produit aucun effet nuisible sur les cellules cultivées en sa présence pendant plusieurs années.

Nous allons maintenant étudier leur effet toxique.

III - EFFET TOXIQUE DE LA NYSTATINE SUR LES CELLULES ANIMALES

Par ses nombreuses utilisations, la nystatine est devenue un antibiotique très important.

Dans une revue sur la thérapeutique des mycoses, Drouhet (16) parle des anciens agents chimiques à base de groupements d'ammonium quaternaire, d'acides gras, de dithiocarbamate ou de benzothiazols comme ayant une valeur curative en applications locales seulement. Pour traiter les mycoses profondes, de nombreux antibiotiques ont été découverts, mais seule la nystatine ne se montre pas toxique.

Les médecins emploient la nystatine surtout dans le cas d'infections par les levures (*Candida*) et associée aux cyclines dans les traitements préopératoires dans le but de se débarrasser des levures intestinales.

De nombreux laboratoires de culture de tissus *in vitro* l'utilisent pour empêcher la contamination par les champignons. Les laboratoires de diagnostic y ont souvent recours pour l'isolement de virus à partir de prélèvements de gorge ou de selles pour la même raison.

Les vigneron s'en servent pour détruire les levures qui contaminent leurs tonneaux.

Les travaux sur la nystatine se poursuivent de deux façons : l'une théorique, consistant à étudier le mode d'action de la nystatine sur les levures, l'autre pratique dans le but de développer son utilisation.

Nous avons essayé d'élucider un troisième aspect du problème, relatif à la toxicité de la nystatine pour les cellules.

Dans le chapitre précédent, nous avons vu qu'au delà d'une certaine concentration, la nystatine se révèle toxique. Nous allons maintenant vérifier que cet

effet toxique est bien dû à la nystatine elle-même, puis rechercher s'il se manifeste par une action externe ou interne.

A - ETUDE DU SPECTRE DE LA NYSTATINE EN ULTRAVIOLET

Avant d'étudier le mécanisme de cette action toxique, nous avons voulu nous assurer que la variation du point critique de toxicité d'un lot à l'autre n'était pas due à une impureté associée à la nystatine.

D'autre part, nous avons tenté de séparer des fractions d'activité différente en réalisant une chromatographie sur colonne.

Méthode

La nystatine, provenant de 4 lots différents, a été mise en suspension dans l'eau, et centrifugée à 24 000 tours par minute pendant 5'. Le spectre de la solution, diluée au $1/10^e$, a été déterminé par des lectures en ultraviolet, faites au spectrophotomètre de Beckman.

Les chromatographies ont été réalisées sur colonnes de N-N diéthylamino éthyl cellulose (provenant de la Cie Eastman-Kodak). Cette cellulose a été préparée selon la méthode de Sober et Peterson (60).

Un volume de la solution de nystatine -variant suivant la hauteur de la colonne- a été placé au haut de la colonne et les fractions ont été récoltées après passage d'eau distillée, de tampon phosphate de pH 7 à 0,01 M, puis à 0,02 M et d'un gradient NaCl à 0,2 M.

Les lectures ont été faites à la longueur de 305 m μ .

Résultats

Le spectre de la solution originale, diluée dans l'eau ou dans l'alcool à 80°, donne la courbe 1 de la figure (1) avec les 4 maxima aux longueurs d'onde de 225-230 m μ , de 295 m μ , de 305 m μ , de 320 m μ et les 3 minima à 255, 300 et 315 m μ . Ce spectre correspond à celui donné par Lampen (45) et a été obtenu pour les 4

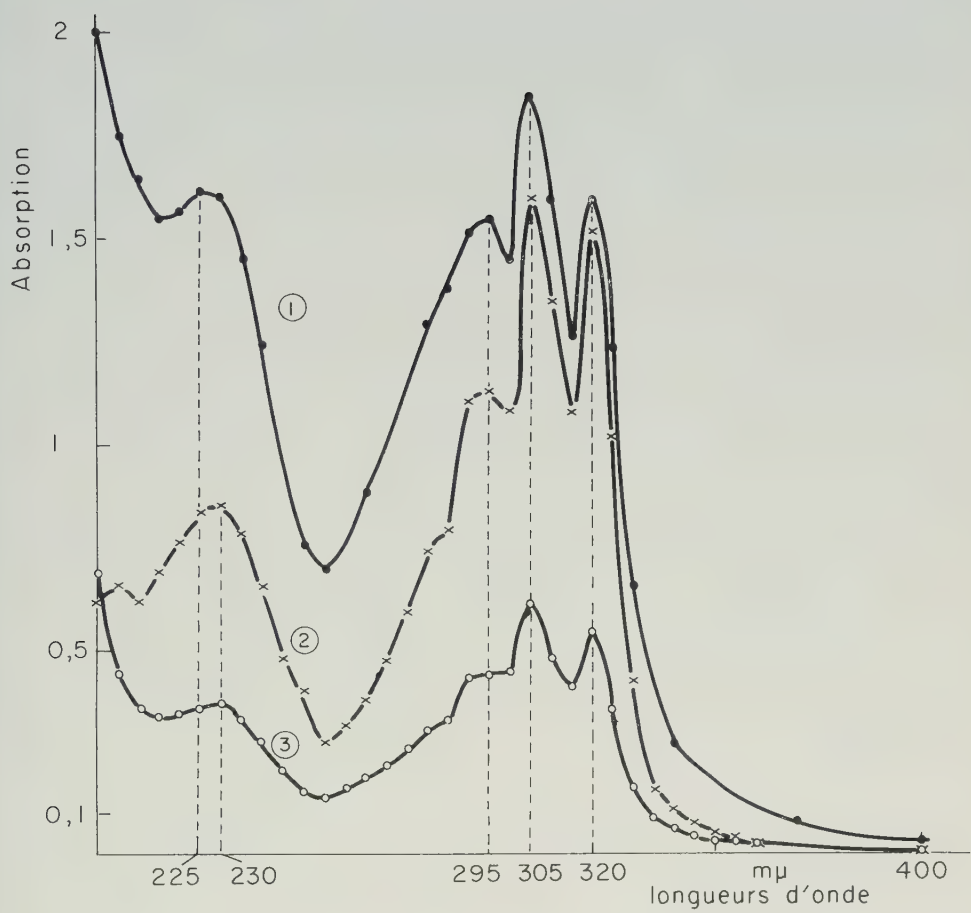


Figure 1 - Spectre de la nystatine en ultraviolet.

$$\frac{\text{Nombre de cellules avec nystatine}}{\text{Nombre de cellules sans nystatine}}$$

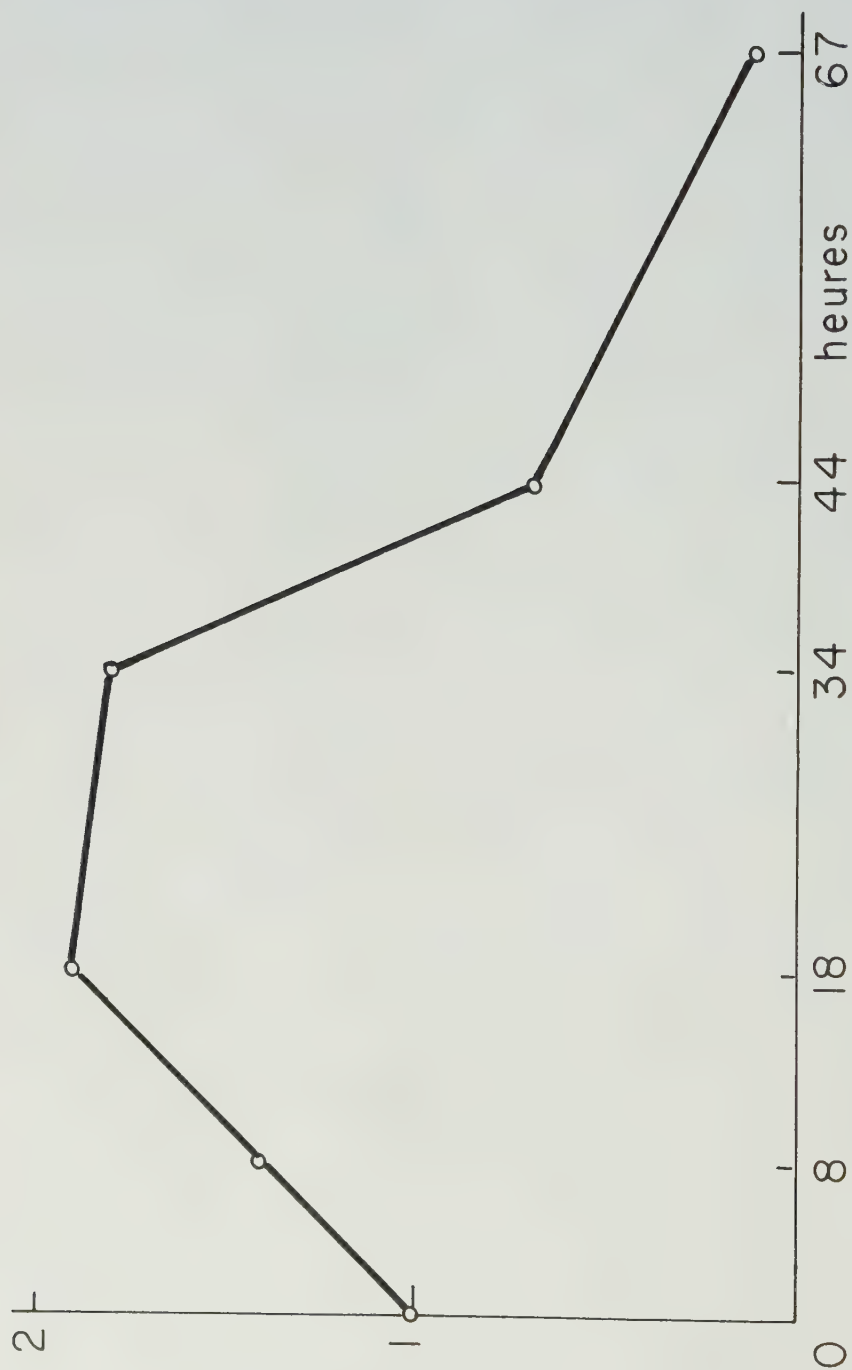


Figure 2 - Evolution du Rapport du nombre des cellules se multipliant en présence et en l'absence de nystatine.

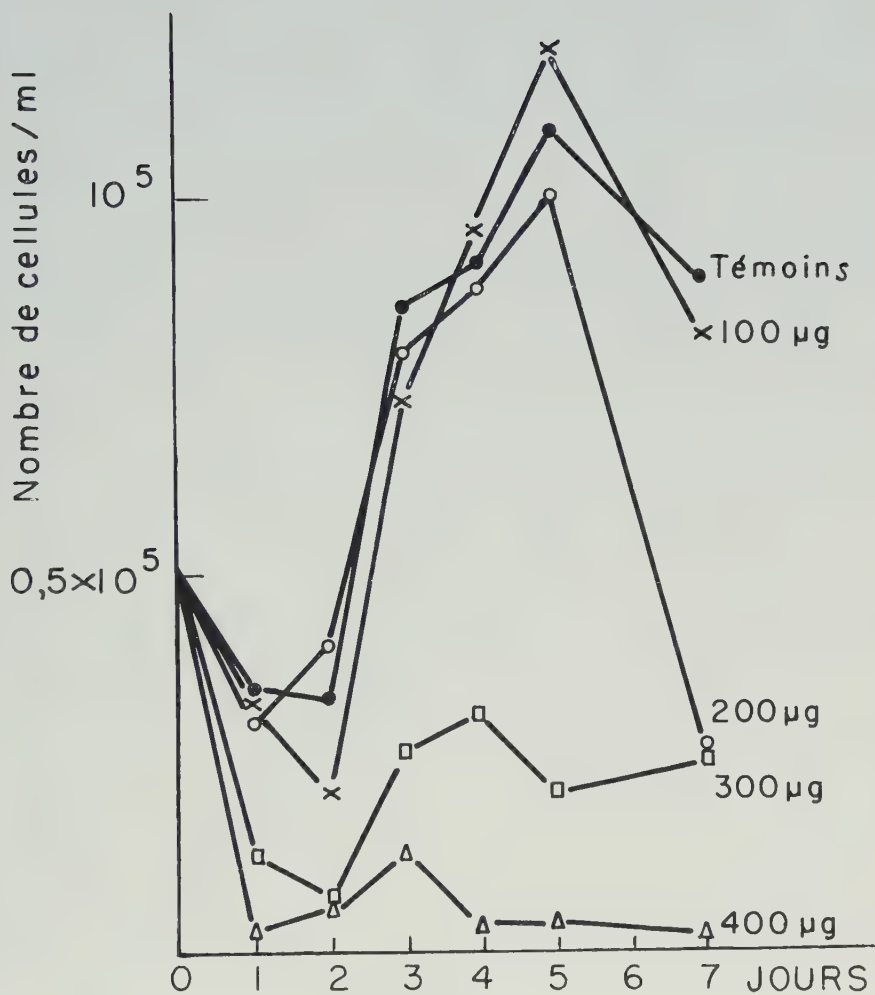


Figure 3 - Multiplication cellulaire en présence de différentes concentrations de nystatine.

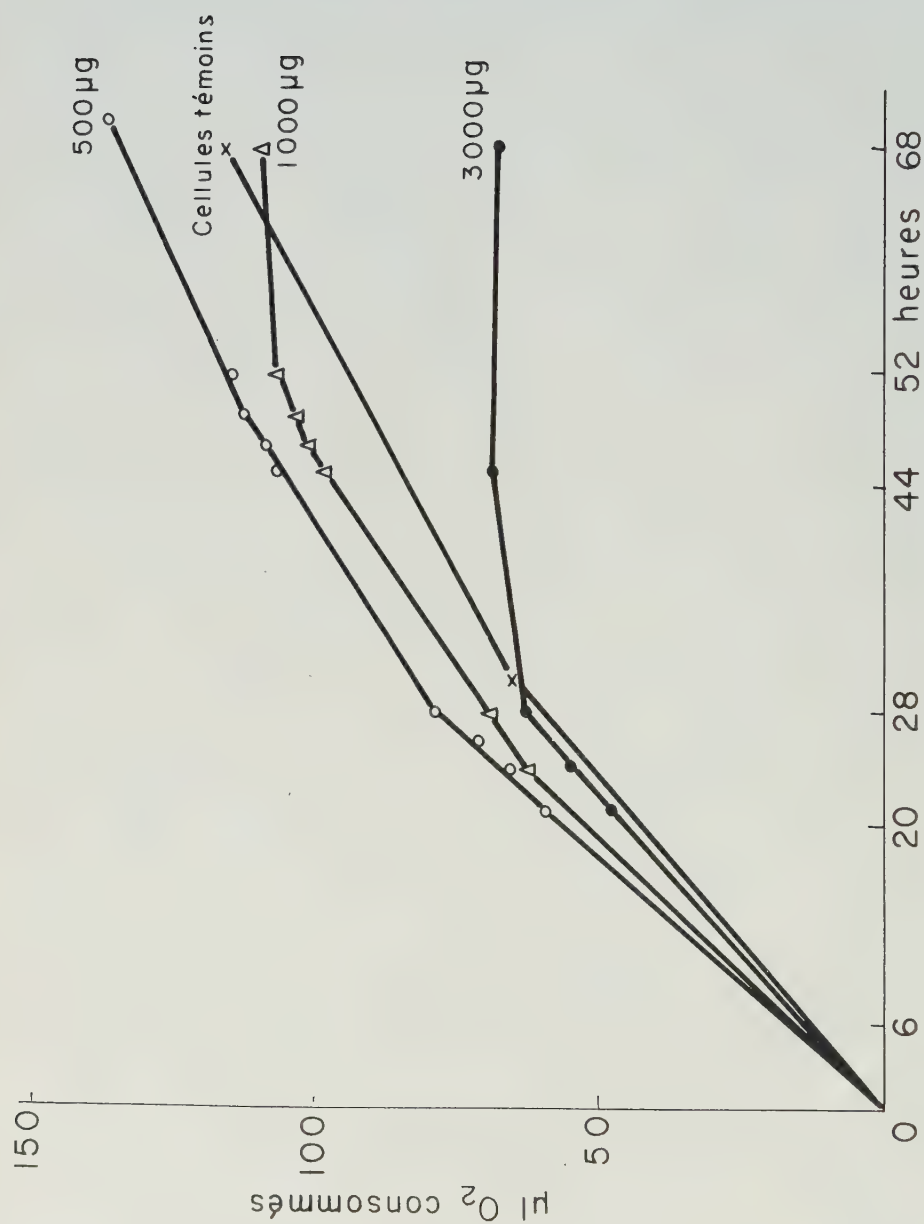


Figure 4 - Consommation d'oxygène de cellules mises en présence de différentes concentrations de nystatine.

lots utilisés. Ces produits sont donc purs.

Le même spectre fut obtenu en utilisant une solution de nystatine ajustée à pH 6 et à pH 8.

Une solution de nystatine, gardée 15 jours à 37°C et ayant donc perdu son pouvoir antibiotique, donne également le même spectre.

Après passage sur colonne, nous avons recueilli une première fraction passant au début avec l'eau distillée, puis une seconde fraction passant avec le tampon à 0,01 M. Le spectre de ces fractions (voir fig. 1, courbes 2 et 3) présente les mêmes maxima et minima que la solution originale.

Les deux fractions après lyophilisation des solutions et remise en solution dans un volume d'eau dix fois plus petit, furent titrées par leur activité sur des spores d'*Aspergillus niger*. Les concentrations critiques, compte tenu des dilutions des 2 fractions par rapport à la solution originale, furent les mêmes. Ces deux fractions seraient donc identiques à la nystatine du point de vue de leur activité.

Sur chaque spectre de fractions et sur le spectre de la solution originale de nystatine ayant perdu son activité antifongique, on retrouve la présence de plateaux sur la partie de la courbe comprise entre les longueurs d'onde de 270 et 285 mμ. Les courbes données par Dutcher (20) (21), établies à partir de différentes solutions de nystatine, ont aussi parfois une pente accidentée aux environs de ces longueurs d'onde. Cela doit donc être normal.

B - ACTION EXTERNE

La nystatine ajoutée au milieu de culture peut changer les conditions de croissance des cellules en modifiant soit le pH, soit l'équilibre osmotique, soit en formant des complexes avec les éléments essentiels à la croissance des cellules.

1. ACTION DU pH

Les suspensions de nystatine utilisées sont nettement acides avec un pH d'environ 6 ; mais, après une dilution au 1/10^e dans le milieu de culture bien tamponné (phosphate, bicarbonate), le pH reste supérieur à la neutralité aux environs de 7,4.

2. ACTION SUR LA PRESSION OSMOTIQUE DES CELLULES.

Un effet sur la pression osmotique des cellules se traduit par une modification morphologique presque immédiate. Nous avons étudié la possibilité d'un tel effet dans le temps grâce à une observation directe au microscope et indirecte sur des lames colorées à l'hémalum-éosine.

Après plusieurs heures de contact avec l'antibiotique à la dose toxique de 3000 mcg/ml, la taille des cellules n'a pas changé. Les photographies, prises après cinq heures, montrent qu'il n'y a pas de différence avec les cellules des tubes-témoins. Les membranes des cellules adjacentes présentent un bord net, alors qu'aux endroits de croissance moins dense, les cellules sont bien étalées sur le verre avec un bord irrégulier et une membrane cellulaire peu visible.

La nystatine ne paraît donc pas avoir d'action sur les phénomènes d'osmose.

3. ACTION PAR LA FORMATION DE COMPLEXES AVEC LES ELEMENTS NUTRITIFS DU MILIEU

On sait que les cellules HeLa peuvent se conserver 1 ou 2 jours dans un état végétatif et reprendre leur croissance dès qu'elles sont replacées dans un milieu nutritif convenable [Eagle (22)].

Donc si la nystatine forme un complexe avec un élément nutritif, essentiel à la croissance des cellules, celles-ci reprendront leur activité métabolique dès qu'elles seront replacées dans un milieu exempt de nystatine.

Méthode

Comme il n'est pas possible de séparer les cellules de la nystatine par simple lavage des cellules ou par centrifugation, nous avons utilisé la méthode de dilution.

La moitié d'une quantité de tubes de Kahn, ensemencées 24 heures auparavant avec 1 ml de suspension cellulaire, est mise en présence d'une concentration de 3 000 mcg. de nystatine par ml. de milieu, soit 0,3 ml pour chaque tube.

Après 8, 18, 44 et 67 heures d'incubation, les cellules de 7 tubes sont récoltées par trypsination et centrifugation ; le surnageant est jeté et les cellules sont réunies pour ensemencer une bouteille de pharmacie avec 20 ml de milieu ($0,3 \times 7$ tubes = 2,1 ml de nystatine). Les 2,1 ml de nystatine des 7 tubes sont donc dilués au $1/10^3$ et nous savons par titrage préalable que 300 mcg de nystatine ne constituent pas une dose toxique. Après plusieurs jours, les cellules sont comptées à l'hémocytomètre après coloration des cellules mortes par l'érythrosine B. (63)

Résultats

La courbe de la figure 2 exprime le rapport du nombre de cellules provenant des bouteilles contenant de la nystatine avec le nombre de cellules réensemencées à partir des bouteilles-témoins.

Après cinq heures, il y a stimulation de la croissance par la nystatine. Au bout de 18 à 36 heures la croissance est égale, le rapport étant proche de 1. Donc jusqu'à 36 heures, l'effet toxique de la nystatine est réversible.

A 48 heures, le rapport est inférieur à 1 ; à 72 heures, il devient très faible, la croissance des cellules étant arrêtée de façon irréversible.

Si l'action toxique de la nystatine sur les cellules était due à la formation d'un complexe de la nystatine avec un ou plusieurs éléments nutritifs du milieu,

essentiels à la croissance cellulaire, les cellules placées 5, 18 ou 40 heures au contact de la nystatine, puis remises dans un milieu complet, devraient reprendre leur croissance de la même façon. Or il n'en est pas ainsi. Il semble donc que la nystatine ne soit toxique qu'après avoir agi sur les cellules elles-mêmes. C'est ce que nous allons maintenant étudier.

C - ACTION INTERNE

Après avoir pénétré dans la cellule, la nystatine peut agir suivant des modes différents : soit par simple accumulation de l'antibiotique dans le cytoplasme, soit par réaction sur les constituants cellulaires en empêchant ainsi les processus normaux de mitose ou de métabolisme.

1. SIMPLE ACCUMULATION DE L'ANTIBIOTIQUE DANS LES CELLULES

Si la nystatine s'accumule dans le cytoplasme elle entraînera un certain déséquilibre.

Pour mettre en évidence le phénomène, nous avons dosé l'antibiotique accumulé dans les cellules, le taux devant être supérieur à celui du milieu ambiant.

Méthode

Ces expériences ont comporté 2 parties ; la première consistant à faire pousser les cellules en présence de concentrations variables de nystatine, puis à récolter les surnageants et le contenu cellulaire ; la seconde, à titrer l'activité antifongique des liquides recueillis.

Des tubes Pyrex ont étéensemencés avec 100.000 cellules dans 1.4 ml de milieu. Les tubes-témoins ont reçu en plus 0,6 ml d'eau distillée stérile.

Pour ne pas avoir à se préoccuper du précipité de nystatine attaché aux cellules, nous avons centrifugé

la suspension originale de nystatine cinq minutes à 2 000 tours par minute et préparé 4 dilutions (1:2) à partir du surnageant. 0,6 ml de chaque dilution ont été ajoutés aux tubes, soit 0,3 ml ou 3 000 mcg par ml de milieu.

Nous avons de plus préparé des tubes-témoins contenant seulement les dilutions de nystatine afin d'éliminer le facteur de dégradation dus au temps et à la chaleur.

Chaque jour, pendant 4 jours, 6 tubes de chaque dilution ont été centrifugés et les surnageants conservés en un tube S1. puis les cellules ont été lavées avec la solution saline de Earle, centrifugées et les surnageants réunis en un tube S2. Enfin les culots cellulaires ont été à nouveau remis en suspension dans la solution de Earle, puis congelés et dégelés deux fois pour libérer la nystatine intracellulaire. Les tubes S1, S2 et C et les tubes de la dilution de nystatine correspondants ont été gardés à -20°C .

Les titrages ont été faits en incubant 1 ml de chaque tube récolté avec 0,1 ml de 5 dilutions de spores d'*Aspergillus niger*.

Le tableau 7 indique le résultat de lectures des tubes faites à 6 jours d'incubation.

Résultats

L'activité antifongique de la nystatine à l'intérieur des cellules augmente avec la concentration de nystatine présente dans le milieu. Ainsi aux faibles concentrations, ne découvre-t-on aucune trace d'activité ; la nystatine ne pénètre pas dans les cellules et n'est pas toxique.

Aux concentrations très toxiques, une activité antifongique se manifeste dès le premier jour. La nystatine a pénétré dans les cellules ; elle s'y est fixée puisque les solutions de lavage S2 ne sont pas actives, elle y demeure puisque l'activité ne change pas avec le temps d'incubation et cette activité persiste aussi longtemps que celle de la même solution de nystatine

TABLEAU 7

TITRAGE DE LA NYSTATINE A L'INTERIEUR DES CELLULES
ET DANS LES SURNAGEANTS

Temps de contact de la nystatine avec les cellules	Nombre de spores d' <i>Aspergillus niger</i> par ml	Témoins			750 mcg/ml				1500 mcg/ml				3000 mcg/ml			
		S1	S2	C	Ny	S1	S2	C	Ny	S1	S2	C	Ny	S1	S2	C
24 heures	10^3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	10^4				-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	10^5				-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
	10^6				-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
48 heures	10^3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^4				-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^5				-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^6				-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
72 heures	10^3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^4				-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^5				-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^6				-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
96 heures	10^3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^4	-	-		-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^5				-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	10^6				+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Ny : milieu de culture sans cellules avec nystatine

S1 : milieu de culture des cellules récoltées

S2 : surnageants des cellules lavées

C : cellules brisées

+

dans le milieu seul. Les cellules n'altèrent pas la nystatine qui conserve intacte son activité antibiotique.

Aux concentrations moyennement toxiques, il faut plus de 24 heures d'incubation pour qu'une activité se manifeste à l'intérieur des cellules. Ainsi une concentration plus faible retarde-t-elle seulement la pénétration de la nystatine dans les cellules.

Enfin nous avons remarqué que pendant les premières 24 heures, la nystatine entre dans la cellule et en sort librement : les surnageants S2 manifestent une certaine activité qui ne se reproduit plus par la suite.

La nystatine pénètre donc dans les cellules ; elle s'y fixe et interfère probablement avec quelque processus métabolique.

2. FORMATION DE COMPLEXES INTRACELLULAIRES

Pour tenter de comprendre par quel mécanisme interne la nystatine devient toxique pour les cellules, nous allons étudier parallèlement leur métabolisme, leur morphologie et leur mitose en présence de l'antifongique.

Une première indication du mécanisme pourrait nous être fournie par la forme des courbes de croissance des cellules.

Ces courbes peuvent être établies de deux façons. soit par numération cellulaire, soit par mesure de leur respiration en fonction du temps et de la concentration de l'inhibiteur.

a) Courbes de croissance par numération cellulaire

Méthode

Des tubes sontensemencés avec 50.000 cellules HeLa dans 1 ml du milieu. Puis en même temps des dilutions de nystatine dont la dose toxique est de 400 mcg par ml pour ce lot, ont été ajoutées aux tubes de telle façon que la concentration finale soit de 400, 300, 200 et 100 mcg par ml. Les tubes ont été incubés à 37° C dans une position verticale. Chaque jour, 3 tubes de chaque dilution ont été centrifugés. Après avoir jeté les sur-

nageants, on ajoute 2 ml de trypsine dans chaque tube. Au bout de cinq minutes les tubes contenant la même dilution ont été réunis dans un volume de 3 ml de Hanks ; puis le colorant, l'érythrosine [Phillips et Terryberry (63)] a été ajouté afin de permettre la différenciation entre les cellules vivantes et les cellules mortes (rouges). Seules les cellules vivantes, non colorées, sont comptées à l'hémocytomètre.

Résultats

La courbe typique de la figure 3 révèle qu'aux faibles concentrations (100 et 200 mcg par ml) la nystatine a un effet stimulant : le nombre des cellules devient en effet nettement supérieur à celui qui est fourni par les tubes témoins. Mais après le troisième jour, la concentration de 200 mcg par ml se montre toxique et le nombre des cellules décroît. Cette valeur correspond à la concentration minima de toxicité pour les cellules telle que nos titrages permettent de l'évaluer.

Plus la concentration est forte, plus tôt apparaît la toxicité. Il y a donc une relation directe entre cet effet et la concentration de la nystatine.

La perte des cellules qu'on observe dans tous les tubes (y compris les tubes témoins) à la lecture du premier jour peut être expliquée par le manque d'adhésion au verre.

b) Mesure de la respiration des cellules

Nous savons qu'une des conditions essentielles à la vie est la respiration. La quantité d'oxygène consommée par des cellules en suspension a été mesurée de deux façons : par la méthode du plongeur cartésien [Danes et coll. (14) ; Prop (65)] et par l'appareil de Warburg. C'est ce dernier système que nous avons employé en suivant les indications données dans le manuel de Umbreit (73).

Les détails de la technique ont été exposés au chapitre I n°5.

Résultats

Le lot qui a été employé ici possède une concentration toxique minima de 500 mcg par ml.

Les courbes (figure 4) de croissance, suivies pendant 66 heures au moins, nous donnent les renseignements suivants :

A la dose faiblement toxique de 500 mcg par ml., nous observons un effet stimulant de la respiration, lequel se manifeste jusqu'à la fin de notre expérience.

A la concentration toxique de 1.000 mcg par ml., un effet stimulant parallèle au précédent est suivi, vers la 48ème heure, d'un effet toxique, inhibiteur de la respiration.

A la concentration de 3.000 mcg par ml., la consommation d'oxygène est légèrement supérieure ou égale à celle des cellules-témoins jusqu'à la 28ème heure. A ce moment, il y a arrêt de la respiration.

Ces résultats coïncident avec ceux fournis par la méthode de numération cellulaire ; cette dernière étant moins précise, les autres expériences sur le métabolisme seront faites avec l'appareil de Warburg.

c) Facteurs d'inhibition de l'effet toxique

L'aspect typique des courbes de croissance des cellules en présence de la nystatine est supprimé si l'on emploie une concentration de sérum de poulain dans le milieu supérieure à 10 % et si l'on alcalinise le pH du milieu. Ces résultats concordent avec l'étude de Lampen (43) (44) sur la protection des levures contre la nystatine par addition d'albumine sérique au milieu et alcalinisation de ce dernier.

Sachant que l'effet toxique de la nystatine sur les cellules se manifeste aux environs de la 20ème heure de contact par un arrêt de la croissance parallèlement à un arrêt de la respiration, nous allons voir si ces phénomènes sont accompagnés d'un changement dans la morphologie cellulaire et d'une altération

des processus mitotiques.

d) Coloration de cellules faite en relation avec les courbes de croissance

Des colorations de cellules à l'hémalum-éosine aux différents stades de la croissance des cellules HeLa en présence d'une forte concentration de nystatine ont été faites au bout de 5, puis 18, 26, 42 et 72 heures de contact selon la méthode indiquée précédemment au chapitre I n° 6.

Comme nous l'avons remarqué lors de l'étude de l'effet possible de la nystatine sur la pression osmotique, après cinq heures de contact, aucun changement n'apparaît dans la morphologie des cellules, exception faite d'un début de vacuolisation à la périphérie de quelques cellules.

Après 20 heures (*voir figure 5 b*) , les cellules ont un contour normal. La vacuolisation du cytoplasme s'est généralisée à toutes les cellules et à tout le cytoplasme qui a perdu son homogénéité. Toutes les phases mitotiques sont observées quoique le nombre des mitoses soit inférieur à celui qu'on trouve sur les lamelles-témoins. Les nucléoles s'arrondissent et de nombreux noyaux n'ont qu'un gros nucléole rond.

Après 44 heures d'expérience, on observe de nombreuses cellules mortes à noyaux pycnotiques, de nombreuses cellules en voie de dégénérescence ayant un cytoplasme éosinophile, désorganisé, étiré en ponts intracellulaires et des noyaux dont la chromatine se condense en amas centraux ou marginaux. Quelques mitoses normales sont présentes.

A la fin de 72 heures d'incubation, les mêmes phénomènes sont observés ; mais peu nombreuses sont les cellules qui demeurent fixées sur les lamelles (*figure 6 b*).

Pour déterminer s'il se produit de tels effets de désorganisation cellulaire en présence de solutions de nystatine sans précipité, nous avons centrifugé la so-

lution originale de nystatine à 3 000 tours par minute, pendant cinq minutes, recueilli le surnageant (S N), puis suspendu à nouveau le culot de précipité dans de l'eau distillée (P N). L'action de ces deux fractions sur les cellules a été étudiée parallèlement à l'action de la suspension originale.

Au bout de 5 heures d'expérience, les tubes S N et P N ne révèlent aucune différence avec les témoins.

Après 20 heures, les mitoses sont aussi nombreuses que dans les tubes-témoins. Mais alors que les tubes S N présentent une vacuolisation du cytoplasme localisée principalement à la périphérie de la cellule, les tubes P N montrent que la désorganisation a atteint un stade plus avancé. Car, en plus de la vacuolisation généralisée à tout le cytoplasme, on peut commencer à observer déjà la présence de nombreuses cellules à chromatine fragmentée.

Après 44 heures de contact, les tubes S N sont le siège d'une vacuolisation totale du cytoplasme autour de noyaux intacts ou de forme irrégulière. Dans les tubes P N, les phénomènes de dégénérescence cellulaire sont plus accentués qu'à 20 heures ; le nombre de cellules mortes a augmenté ; de nombreuses cellules sont tombées du verre.

A 72 heures, dans les tubes S N, les cellules encore attachées au verre sont rondes avec quelques noyaux pycnotiques ou à chromatine condensée en amas.

Il semble donc que l'effet de la nystatine se traduise par une vacuolisation intense du cytoplasme, entraînant la désorganisation du métabolisme cytoplasmique et, secondairement, du métabolisme nucléaire.

Lorsqu'on utilise seulement la partie soluble dans l'eau de la nystatine, on retarde l'effet toxique ; si l'on utilise uniquement le précipité, on ne retarde l'effet qu'au début, probablement le temps nécessaire pour que le précipité se dissolve à nouveau partiellement dans l'eau. L'effet final est le même dans tous les cas.

e) Dosage du glucose et de l'acide lactique dans les milieux de culture

Il est maintenant évident que la nystatine doit entrer dans les cellules et y provoquer une désorganisation du métabolisme.

On sait que les cellules de lignée stable cultivées *in vitro* ont un métabolisme glucidique caractérisé par une glycolyse aérobie. Warburg (79) différencie les cellules normales et les cellules cancéreuses d'après l'activité glycolytique très supérieure des cellules tumorales et une valeur absolue de leur consommation d'oxygène, faible ; Burk et Shade (8), en travaillant sur des fragments de tissus, ont trouvé également une faible consommation d'oxygène et une forte glycolyse des tissus cancéreux.

Ce critère ne saurait être appliqué aux cellules animales cultivées *in vitro*. C'est l'opinion de plusieurs auteurs : Green et coll. (28) pour les cellules HeLa et KB, Phillips (61, 62) pour les cellules L et HeLa.

Cette glycolyse aérobie étant naturellement importante pour nos cellules, il faut donc vérifier si des concentrations toxiques de nystatine modifient cet aspect du métabolisme cellulaire.

Méthode

Des bouteilles de pharmacie de 250 ml, à forme rectangulaire, ont étéensemencées avec une suspension cellulaire provenant d'une même boîte de Roux à raison de 10^6 cellules HeLa dans 20 ml de milieu, puis incubées à 37° C.

24 heures après, les milieux ont été jetés, puis remplacés par des milieux frais, additionnés d'une concentration toxique de nystatine pour la moitié des boîtes (c'est-à-dire 6 ml d'une suspension de nystatine à 10.000 mcg par ml, plus 14 ml de milieu) et d'eau distillée (6 ml) stérile pour l'autre moitié.

Au bout de 8 heures, puis de 10, 29, 36 et 48 heures, les milieux de deux bouteilles-témoins et de deux

bouteilles contenant la nystatine ont été récoltés. On a ajouté 0,1 ml d'acide trichloracétique à 50 % pour chaque ml du milieu. Le précipité protéinique a été centrifugé et le surnageant conservé à la glacière pour les mesures biochimiques.

La quantité de glucose consommée a été déterminée, après dilution au 1/4, par la méthode de Seifter (71) avec le réactif à l'anthrone et par la méthode de Delsal (15) basée sur la réaction des sucres avec la phénylhydrazine.

L'acide lactique produit a été déterminé, après dilution au 1/100e, par la méthode de Barker et Sumerson utilisant la para-phényl-phénol (2).

Les mesures photométriques ont été faites en lumière visible avec le spectrophotomètre de Beckmann. Le glucose consommé a été obtenu en calculant la différence entre le glucose contenu dans le milieu frais au début de l'expérience et celui contenu dans le surnageant des cultures. L'acide lactique produit a été obtenu en calculant la différence entre l'acide lactique du surnageant et celui qui est contenu dans le sérum du milieu.

Les mêmes mesures ont été faites dans certains cas sur les surnageants récoltés à la fin des expériences avec l'appareil de Warburg.

Résultats

D'après le tableau 8, la consommation de glucose augmente beaucoup dès les premières heures et se poursuit jusque vers la 30e heure, en même temps que s'élève la production d'acide lactique.

Les cellules, en présence de nystatine, ne consomment plus de glucose tandis que les cellules normales continuent à l'utiliser jusqu'à la fin de l'expérience.

On peut également constater que l'acide lactique, produit par les cellules normales, disparaît du milieu. En effet pour les expériences I et II, il reste, après 48 heures, moins d'acide lactique qu'après 30 heures ;

TABLEAU 8

**DOSAGE DU GLUCOSE ET DE L'ACIDE LACTIQUE A PARTIR
DU MILIEU DE CULTURES DE CELLULES PUSSEES
EN BOUTEILLES DE PHARMACIE**

		Glucose consommé*		Acide lactique produit*	
		C	CN	C	CN
Exp I	0	0	0	0	0
	8	168	464	155	255
	20	440	784	373	500
	29	572	808	605	665
	36	816	720	185	535
	48	660	764	545	315
Exp II	0	0	0	0	0
	8	452	452	150	200
	20	604	840	160	585
	29	848	927	365	770
	36	840	796	310	565
	48	988	888	170	605
Exp III	0	0	0	0	0
	7	528	584	105	205
	21	700	824	255	445
	31	728	968	265	435
	45	888	1080	325	595
	54	992	1080	455	575
	70	984	1068	265	595

C : Cellules

CN : Cellules en présence de nystatine

* : En mcg par ml

TABLEAU 9

**DOSAGE DU GLUCOSE ET DE L'ACIDE LACTIQUE DANS LES
SURNAGEANTS D'EXPERIENCES FAITES A L'APPAREIL DE WARDURG**

	Glucose consommé en mcg par ml		Acide lactique produit en mcg par ml		Q _{O2}	
	C	CN	C	CN	C	CN
Exp. I de 24 heures avec la dose toxique de 400 mcg/ml	487,5	625	410	470	109	36,7
Exp. II de 52 heures avec la dose faible- ment toxique de 1000 mcg/ml	1350	1400	725	750	125	110
Exp. III de 66 heures						
avec 500 mcg/ml	945	988	720	845	154	179
avec 1000 mcg/ml	945	1050	720	850	154	157
avec 3000 mcg/ml	945	714	720	351	154	71
Exp. IV de 45 heures						
avec 3000 mcg/ml						
et 10 % de sérum	430	695	460	490	70	44
et 30 % de sérum	1075	1161	600	640	105	94

Q_{O2} : microlitres d'oxygène consommés par les cellules

C : cellules

CN : cellules en présence de nystatine

pour l'expérience III on constate une quantité d'acide lactique moindre après 70 heures qu'après 45 heures. Cet acide doit être utilisé par les cellules pour une synthèse de glycogène ou d'acides aminés.

La nystatine stoppe vers la 30^e heure la production et l'assimilation de l'acide lactique par les cellules.

Des mesures pratiquées sur les surnageants récoltés à la fin des expériences avec l'appareil de Warburg ont donné les mêmes résultats (tableau 9). On remarque en outre que la nystatine est inhibée par une concentration de sérum de 30 %.

D - RESULTATS

De ces expériences, nous pouvons déduire le mode d'action général de la nystatine sur les cellules.

Dès les premières heures de contact, la nystatine pénètre dans la cellule, stimule la respiration, la consommation du glucose, la production d'acide lactique, la croissance ; ces phénomènes ne s'accompagnent pas de changement morphologique.

Puis un effet toxique apparaît d'autant plus tôt que la concentration de l'antibiotique est plus forte. Aux doses très toxiques, il apparaît aux environs de la 20^e heure et se traduit par un arrêt de la respiration et de la croissance, une inhibition de la glycolyse et une vacuolisation générale du cytoplasme. A ce moment l'effet devient irréversible.

C'est en utilisant les méthodes histochimiques actuelles et les études du métabolisme par inhibition et réversibilité des réactions biochimiques à un stade donné, que nous avons tenté de comprendre ce phénomène complexe.

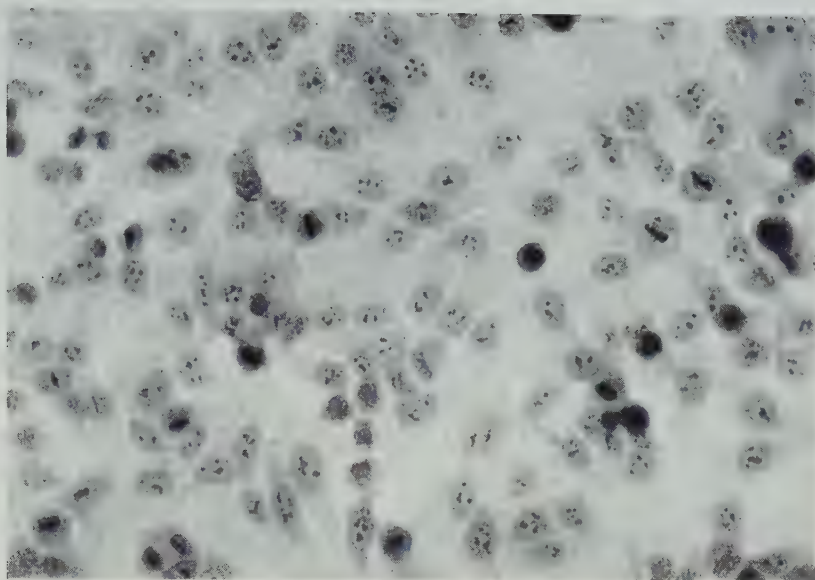


Figure 5 a - Cellules témoins. 260 X.

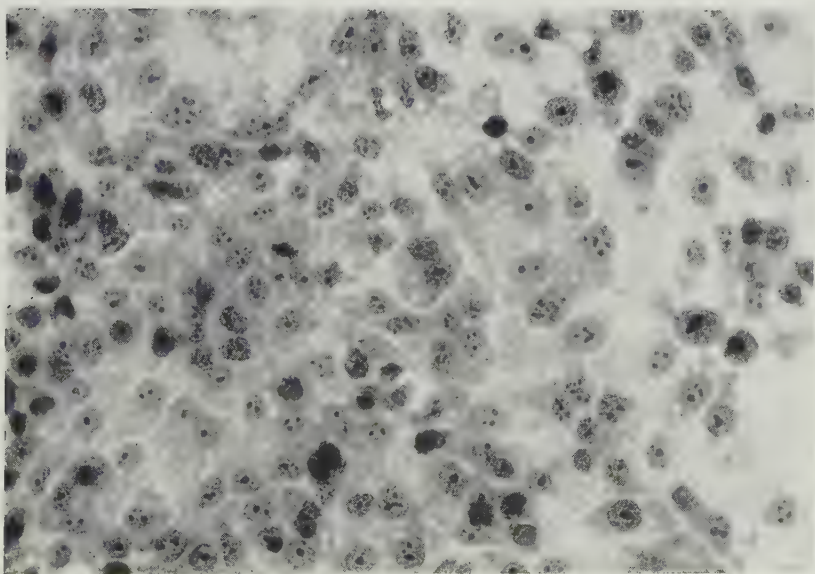


Figure 5 b - Cellules mises 21 heures en présence de nystatine. 260 X.

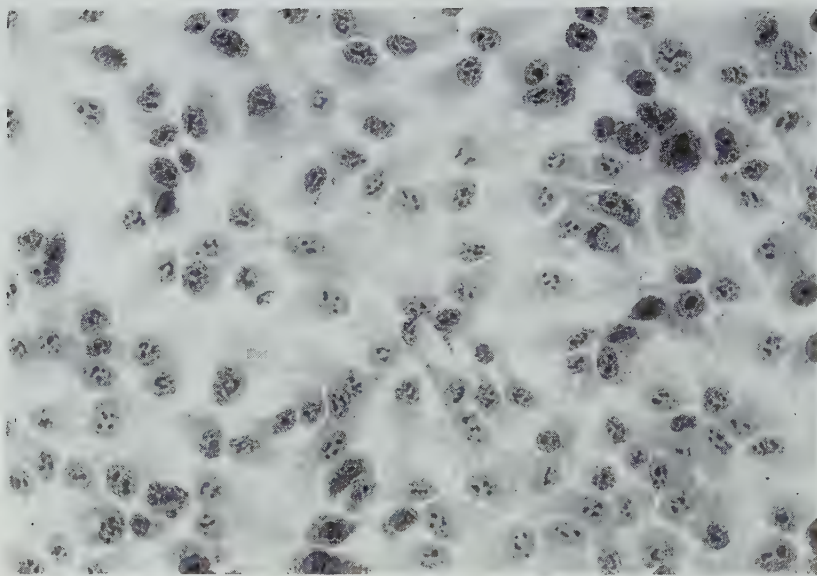


Figure 6 a - Cellules témoins. 260 X.

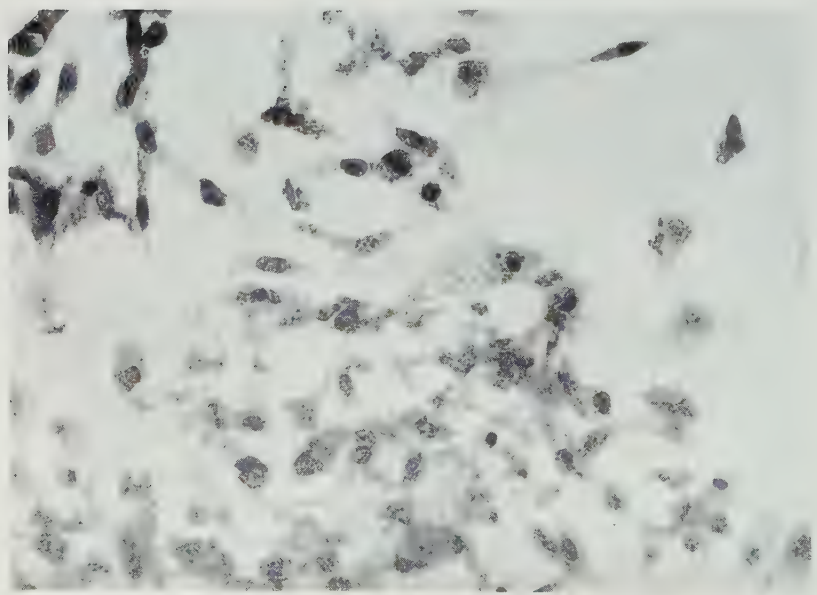


Figure 6 b - Cellules, mises 72 heures en présence de nystatine. 260 X.

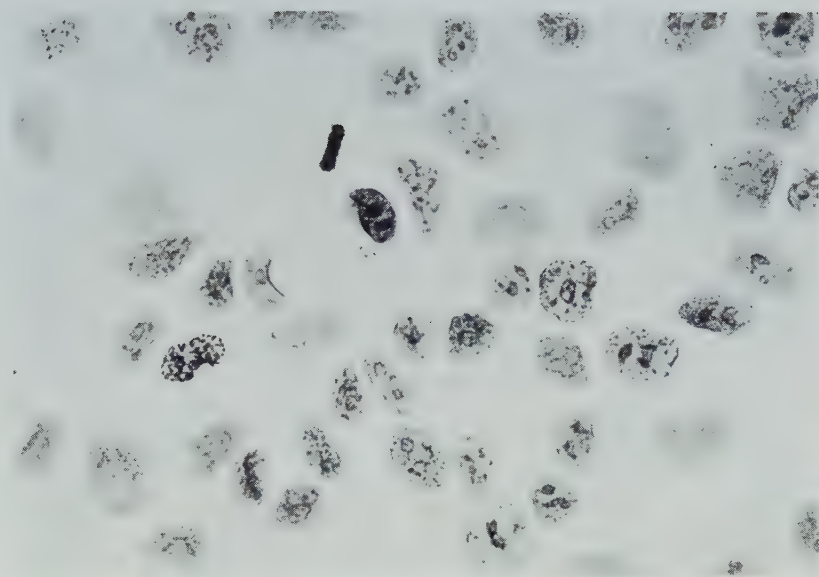


Figure 7 a - Les désoxyribonucléoprotéines.
Cellules témoins. 610 X.

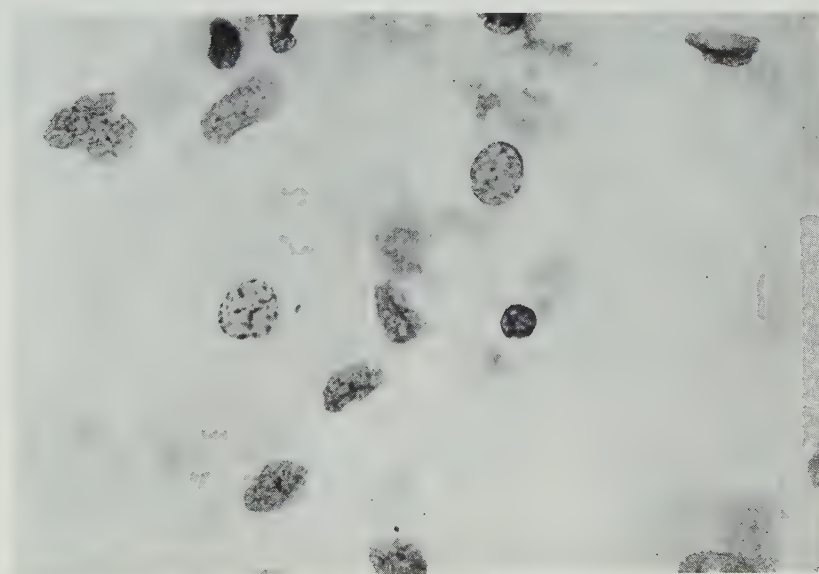


Figure 7 b - Les désoxyribonucléoprotéines.
Cellules, mises 72 heures en présence de nystatine. 610 X.

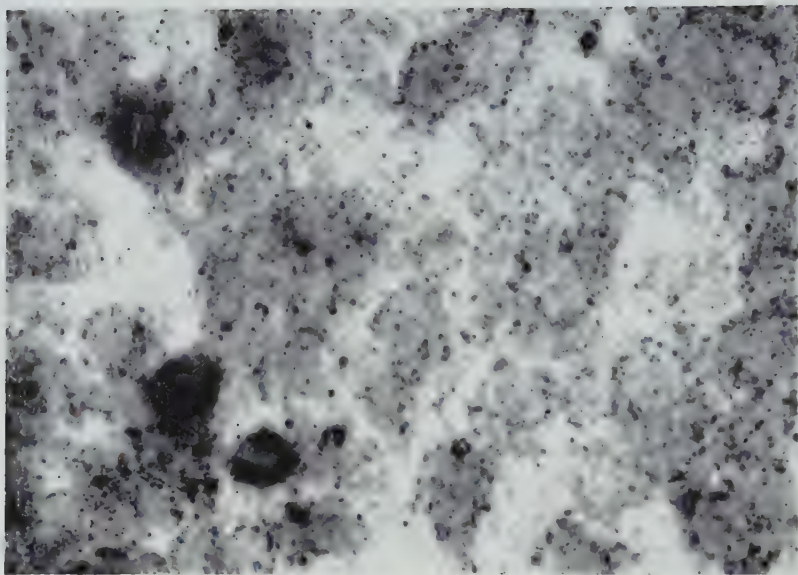


Figure 8 a - Le chondriome.
Cellules témoins. 520 X.

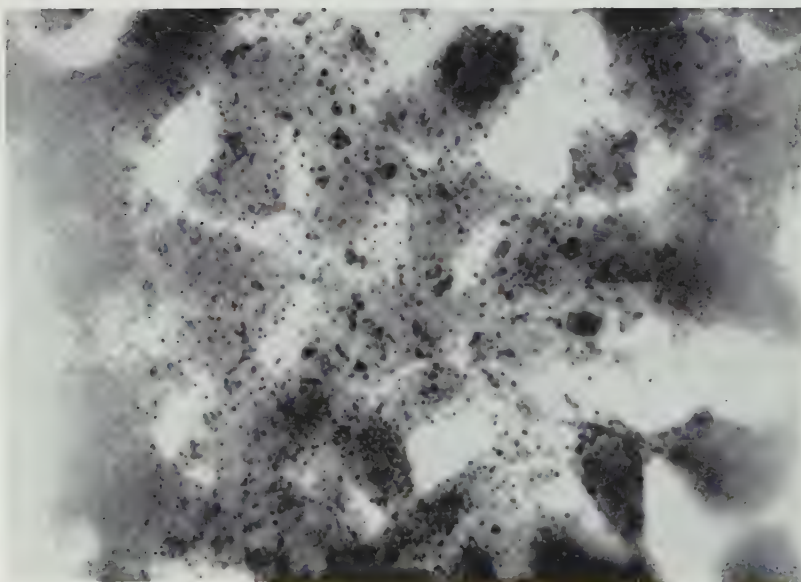


Figure 8 b - Le chondriome.
Cellules, mises 21 heures en présence de nystatine. 520 X.

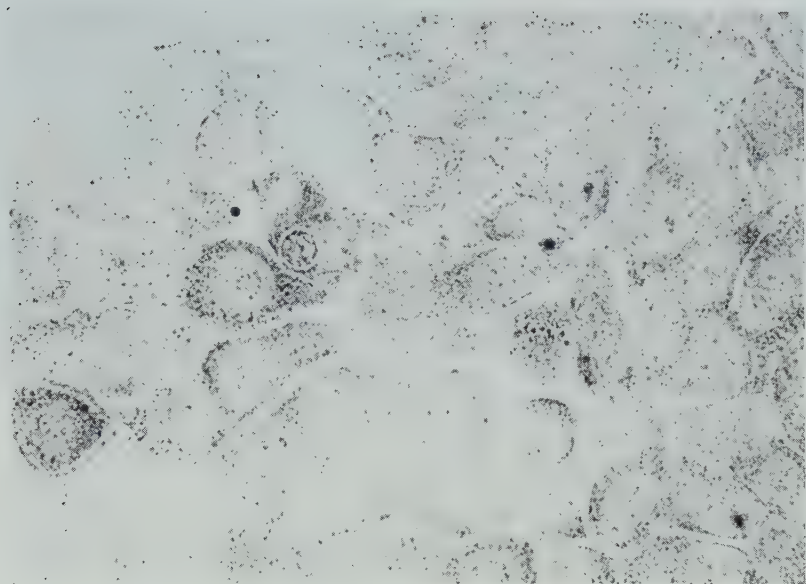


Figure 9 a - Le chondriome.
Cellules témoins. 610 X.

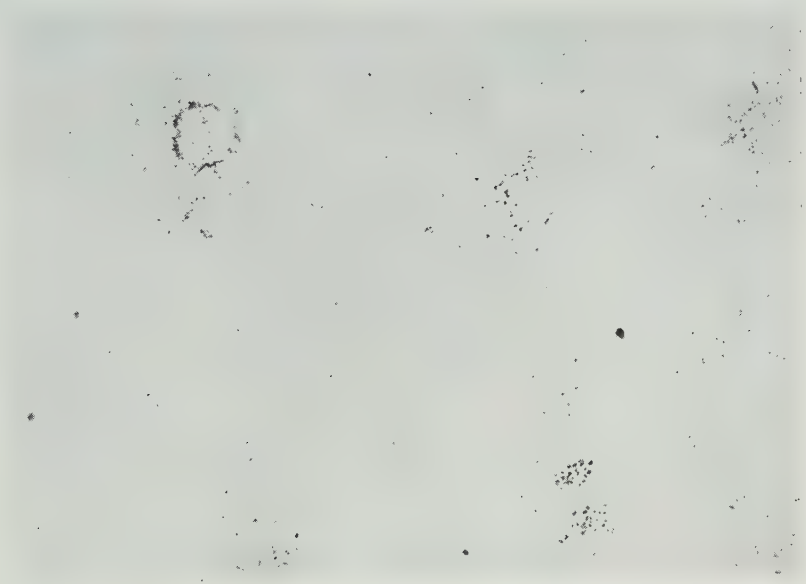


Figure 9 b - Le chondriome.
Cellules, mises 72 heures en présence de nystatine. 610 X.

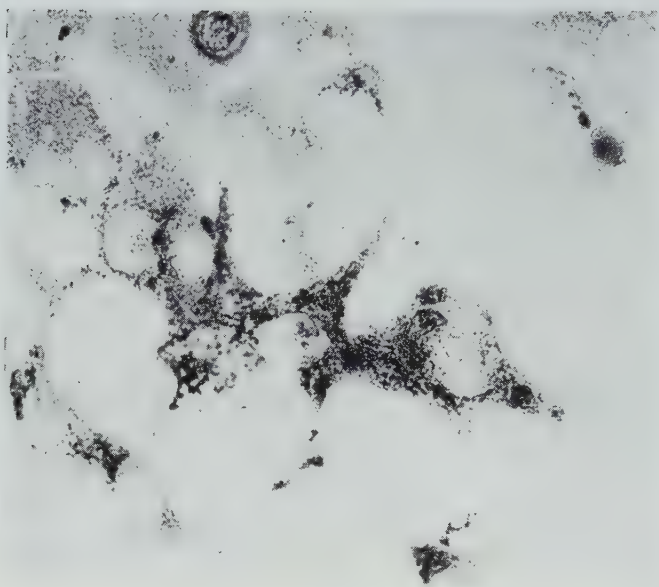


Figure 10 a - Le glycogène.
Cellules témoins. 610 X.

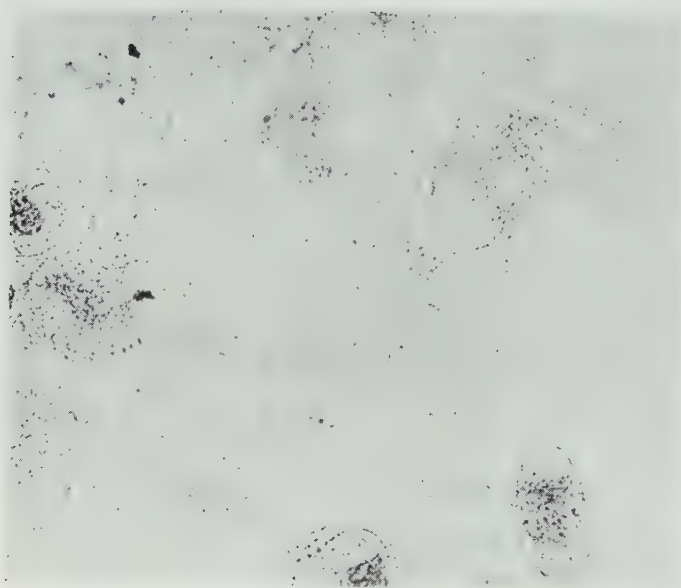


Figure 10 b - Le glycogène.
Cellules, mises 5 heures en présence de nystatine. 610 X.

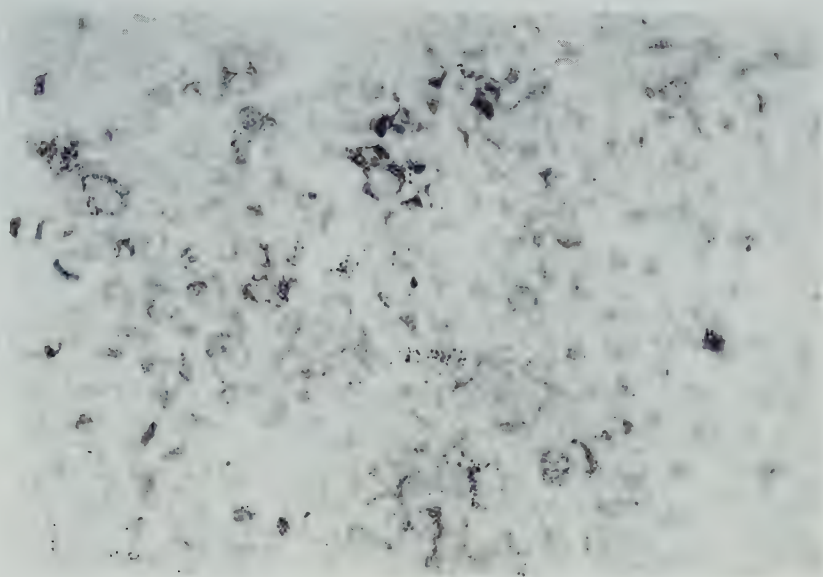


Figure 11 a - Les graisses neutres.
Cellules témoins. 260 X.

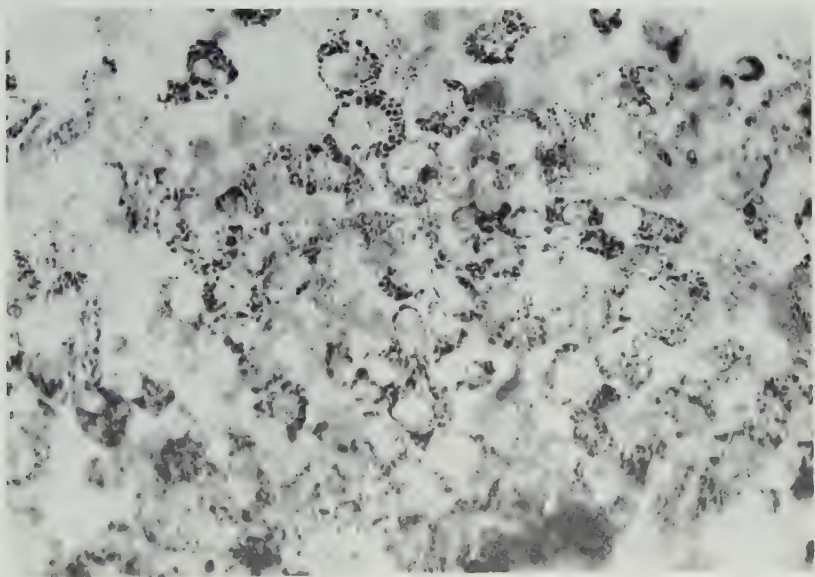


Figure 11 b - Les graisses neutres.
Cellules, mises 44 heures en présence de nystatine. 260 X.

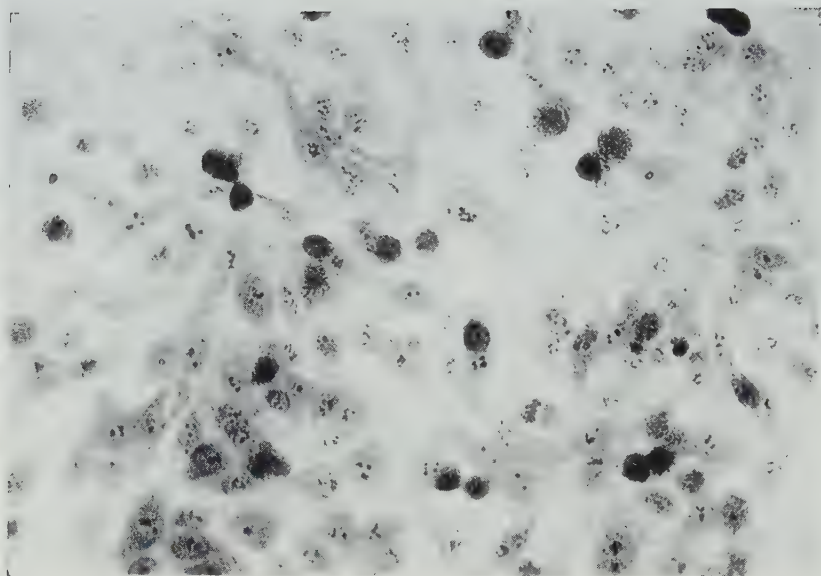


Figure 12 a - Réaction à l'acide phosphomolybdique.
Cellules témoins. 260 X.

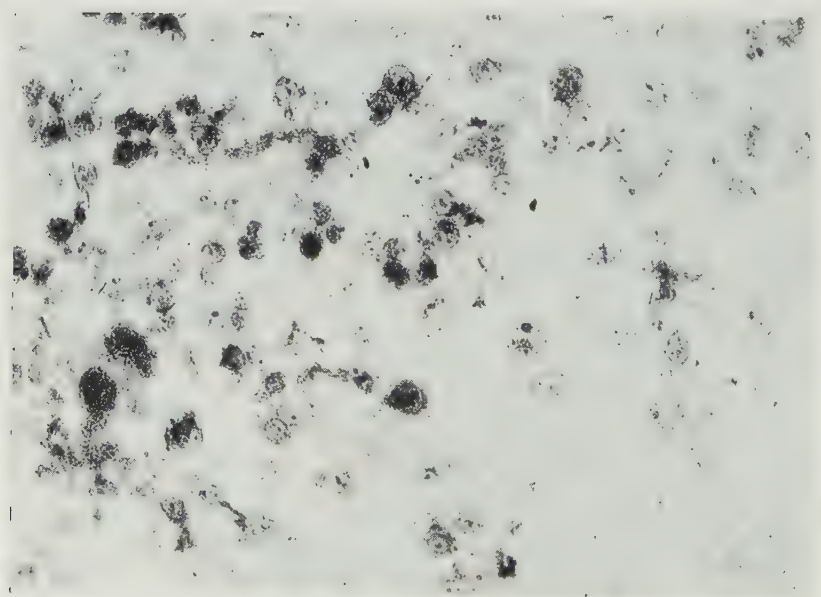


Figure 12 b - Réaction à l'acide phosphomolybdique.
Cellules, mises 72 heures en présence de nystatine. 260 X.

IV - METHODES HISTOCHIMIQUES

Les méthodes histochimiques ont l'avantage de mettre en évidence *in situ* certaines substances chimiques.

Les cellules HeLa, étant déjà fixées sur des lamelles de verre en couche monocellulaire, il est possible de les colorer en sautant les stades de congélation et de coupe. On évite ainsi les pertes de substance des cellules dont une partie a été coupée, ainsi que la désorganisation des éléments cellulaires.

De nombreux corps diffusent facilement à travers la membrane cellulaire (surtout des enzymes) ; mais, en général, les substances qu'on veut déceler se trouvent sous forme de complexes protéiniques qu'il est plus aisé de localiser.

Toutefois, les artifices de coloration ou de localisation sont toujours à prendre en considération. Seules les réactions ayant une valeur spécifique, considérée jusqu'à présent comme absolue, ou offrant les possibilités d'un contrôle strict, ont été employées au cours de cette étude.

Toutefois la minceur des cellules présente un gros désavantage : les méthodes sans grande sensibilité fournissent des réactions négatives pour des substances que révèlent cependant les méthodes de dosage biochimique. Nous avons donc suivi l'avis de Lison (51) : une réaction positive prouve la présence de la substance cherchée, alors qu'une réaction négative n'indique pas nécessairement l'absence du produit.

La technique de culture sur lamelles utilisée a été exposée au chapitre I n° 6.

Les colorations ont été faites après 5, 21, 44 et 72 heures d'incubation en présence d'une concentration toxique de nystatine.

1 - LES DESOXYRIBONUCLEOPROTEINES

La méthode classique de Feulgen et Rossenbeck a été utilisée. Nous avons suivi les indications données par Lison [p. 736 (51)] utilisant le fixateur de Helly, et pratiquant une hydrolyse de 8 minutes.

Pour contrôler la réaction, nous avons omis l'hydrolyse dans l'acide chlorhydrique normal.

Résultats

Dans les cellules normales, la coloration vive rouge violet caractéristique est localisée dans les noyaux, sous forme de granulation plus ou moins fine du nucléoplasme et parfois de grains disposés autour des nucléoles incolores. (figure 7 a.)

Dans les cellules en mitose, tous les stades sont mis en évidence par la condensation de la chromatine.

La coloration diffuse du cytoplasme ou de certaines inclusions intracytoplasmiques n'est pas spécifique de l'acide désoxyribonucléique ; car cette coloration persiste sur les lames de contrôle.

Aucune différence n'est observée entre les lames témoins et les lames des tubes contenant la nystatine jusque vers la 40e heure.

À ce moment, ces lames (figure 7 b.) présentent un grand nombre de cellules à noyaux pycnotiques, denses, ayant souvent leur chromatine condensée en amas localisés à la périphérie du noyau. Le nombre des mitoses est diminué ; mais les figures chromosomiques sont normales. Les nucléoles sont de forme arrondie.

À 72 heures, sont encore visibles quelques rares mitoses normales et de nombreux noyaux pycnotiques.

Il est donc évident que la nystatine n'a pas d'effet sur les processus mitotiques des cellules et que la réduction du nombre des mitoses est un phénomène secondaire.

2. LES RIBONUCLEOPROTEINES

La méthode de Brachet, utilisant le mélange de vert de méthyle et de pyronine, a été employée. Une fixation au Carnoy a été suivie de l'utilisation de la technique modifiée de Pearse [p. 825 (59)].

Cependant nous avons coloré nos cellules pendant 4 heures et plus, et différencié rapidement dans un mélange d'alcool absolu et d'acétone (aa), suivi d'un bain d'alcool absolu, puis de xylol. En effet la coloration des protéines par la pyronine est facilement réversible dans l'alcool ou l'acétone. Si l'on ne colore que pendant une heure, une différenciation rapide ôte presque toute la pyronine et une différenciation très rapide donne lieu à des lames floues.

L'action de la ribonucléase (diluée au 1/5000 dans l'eau distillée) pendant 30 mn à 60°C, faisant disparaître toute coloration rouge par la pyronine, a montré la spécificité de la réaction.

Résultats

Les ribonucléoprotéines des cellules normales, colorées en rouge vif, sont localisées dans les nucléoles et uniformément dans tout le cytoplasme. La chromatine est colorée en vert ou en bleu-vert.

A partir de 21 heures, on remarque dans les cellules incubées dans la nystatine une tendance des nucléoles à s'arrondir ; le cytoplasme commence à former un réseau rouge.

Après 44 heures, les mailles du réseau sont très lâches ; la couleur rouge est moins intense. Les nucléoles sont ronds et souvent réduits à un seul nucléole par noyau. Les nombreuses cellules pycnotiques présentent une bande rouge de cytoplasme autour du noyau.

A 72 heures, le cytoplasme est incolore ; les nucléoles sont ronds, petits, rouge vif. Peu de cellules demeurent sur la lamelle, les cellules pycnotiques mortes étant détachées du verre.

L'effet de la nystatine se traduit donc par une

répartition non homogène des ribonucléoprotéines dans le cytoplasme, puis par leur disparition. Au contraire dans les nucléoles, les ribonucléoprotéines demeurent présentes jusqu'à la désintégration complète des noyaux.

3. LE CHONDRIOME

Nous avons d'abord coloré le chondriome avec un mélange de vert Janus à 0,006 % et de rouge neutre à 0,01% dans l'eau physiologique, comme le recommandent Love et Sharpless (53).

Puis nous avons utilisé la technique de Love et coll. (52), fondée sur la formation d'un complexe des ribonucléoprotéines mitochondriales, colorées par le bleu de toluidine, avec la partie lipidique des mitochondries, combinée avec le mercure du fixateur.

Les deux méthodes nous ont donné les mêmes résultats du point de vue de l'action de la nystatine. Nous ne parlerons ici que de la seconde, qui nous a permis d'obtenir des préparations permanentes.

Résultats

Les mitochondries sont colorées en bleu foncé. Dans les cellules-témoins, elles sont très nombreuses (fig.8a. et fig.9 a.) et se présentent sous la forme de grains ou de courts filaments. Leur taille est uniforme.

Cependant, dans quelques cellules, on peut voir quelques mitochondries agglomérées, plus grosses, localisées près de la membrane nucléaire ou dans le cytoplasme. Les cellules en mitose ont toujours deux ou trois amas de mitochondries agglomérées.

Après 5 heures d'incubation des cellules avec la nystatine (fig.8 b.), on constate une augmentation du volume des mitochondries dans quelques cellules. Ce phénomène s'accroît sur les lamelles, colorées après 21 heures.

Enfin, après 44 heures (fig. 9 b.), le cytoplasme dont la pâleur est due à l'absence des ribonucléoprotéines, est parsemé de mitochondries, en nombre de plus

en plus réduit, de forme ronde et souvent gonflée.

Donc la nystatine, dès les premières heures de contact avec les cellules, provoque un gonflement des mitochondries qui disparaissent peu à peu du cytoplasme.

4. LES POLYSACCHARIDES

Tous les polysaccharides, à l'exception de mucopolysaccharides acides, donnent une réaction positive avec la méthode de Schiff (dite PAS).

Le glycogène nécessitant un mode spécial de fixation, nous exposerons séparément les résultats obtenus.

a) Les polysaccharides

Nous avons utilisé le procédé de Mc Manus tel qu'il est exposé dans l'ouvrage de Lison [p. 740 (51)].

Résultats

Après coloration, les cellules présentent l'aspect suivant : les noyaux sont incolores, le cytoplasme est d'un rose pâle, diffus, plus foncé près des noyaux et contient souvent des inclusions rondes, plus ou moins grosses, rouges ; les cellules en mitose ont un cytoplasme rouge et les chromosomes sont incolores, les cellules mortes ont également un cytoplasme rouge, condensé autour du noyau.

La répartition de la coloration des cellules en présence de nystatine demeure sans changement jusque vers la 44e heure. A ce moment, la plupart des cellules présentent un cytoplasme incolore et il y a beaucoup de cellules mortes. Le précipité de nystatine lui-même prend la coloration rouge.

Pour déterminer si cette substance à réaction positive avec le PAS était du glycogène, nous avons, avant coloration, incubé les cellules dans un bain contenant de la maltase à 1 % et à 10 %. La coloration est demeurée sans changement.

Il s'agit donc de mucopolysaccharides, de mucoprotéines ou de glycoprotéines qui disparaissent du cytoplasme de la cellule au fur et à mesure de son intoxication par la nystatine.

b) Le glycogène

Par suite de la grande solubilité et de la diffusibilité du glycogène, on ne peut le mettre en évidence *in situ* qu'en employant une méthode différente de fixation.

Le liquide de Gendre, saturé d'acide picrique, recommandé par Lison [p.746 (51)] a donc été utilisé. Du fait que ce fixateur contient du formol, il faut laver soigneusement les cellules avant coloration. Nous n'avons pas recouvert nos lames d'un film de collodion, car il ne s'est produit aucune amélioration dans la coloration de nos préparations.

Résultats

Les cellules ne sont pas colorées de façon uniforme ; certaines d'entre elles présentent un cytoplasme très rouge ; d'autres un cytoplasme rose ; d'autres enfin des inclusions rouge vif. (fig.10 a.)

Le traitement à la diastase à 5 % pendant une heure à 37° C supprime la coloration rouge du cytoplasme, mais non point complètement : quelques inclusions intracytoplasmiques restent rose-lilas ; enfin une coloration rose localisée près du noyau persiste dans la plupart des cellules. Ceci correspond aux éléments cellulaires colorés par la méthode usuelle de coloration par le PAS.

Après cinq heures de contact avec la nystatine, le cytoplasme n'est plus rouge et demeure pratiquement incolore jusqu'à la mort des cellules (fig.10 b.). On peut donc dire que sous l'action de la nystatine, toute la réserve de glycogène des cellules est utilisée, que le glucose du milieu ne s'accumule pas dans les cellules et qu'il est, lui aussi, immédiatement utilisé.

5. LES GROUPES SULFHYDRYLES

Nous avons utilisé le test de Frédéric et Chèvremont [voir Pearse p.803 (59)]; mais nous avons fixé les lames cinq minutes avec de l'acide trichloracétique à 5 % ; puis pour réduire les groupements (-S-S-) qui ne réagissent pas, nous avons placé les lames pendant une heure dans du thioglycolate de sodium à 0,2 M dans un tampon au Tris à pH 8. Après lavage à l'eau et acidification par un passage dans l'acide acétique à 1 %, nous avons coloré, comme l'indique la technique, par le ferri-cyanure de potassium.

Résultats

Les cellules sont très faiblement colorées. Le cytoplasme est gris-bleu, seul le cytoplasme des cellules en mitose est bleu. Vers la 30^e heure, le cytoplasme devient un peu plus coloré en bleu pâle, de façon diffuse.

L'action du chlorure mercurique en solution aqueuse saturée inhibe entièrement la coloration en une heure.

De même si l'on a placé les cellules, après fixation, pendant 2 heures à 37°C, les unes dans de l'acide iodoacétique à 0,01 M, neutralisé par la soude normale pour obtenir un pH de 8, les autres dans de l'eau distillée, dont le pH est aussi ajusté à pH 8, on constate que les premières ne sont pas colorées, tandis que les secondes sont gris-bleu avec des cellules en mitose bleues.

Dès la 21^e heure de contact des cellules avec la nystatine, le cytoplasme est bleu et l'intensité de la couleur augmente jusque vers la 44^e heure. Les cellules mortes, ainsi que quelques inclusions intracytoplasmiques sont bleues. La nystatine provoque donc une augmentation des groupements sulfhydryles dans les cellules. Le même phénomène est visible directement sur les lames colorées sans passage par le thioglycolate.

6. LES GRAISSES NEUTRES

Le Soudan noir est reconnu comme étant le meilleur

colorant général des lipides [voir Pearse p.855 (59)]. Nous l'avons donc utilisé, dissous à saturation dans l'alcool à 70°, après fixation des cellules au formol-calcium de Baker.

Résultats

Les cellules présentent en quantité variable des gouttelettes de graisse colorées en bleu noir, intracytoplasmiques. Ces gouttelettes sont généralement absentes des cellules en mitose. Leur nombre augmente un peu avec l'âge de la cellule. (*voir figure 11 a.*).

Dès la 5e heure d'expérience, les cellules en présence de nystatine présentent un nombre de gouttelettes de graisse supérieur à celui des cellules normales.

Après 21 heures, les gouttelettes deviennent plus grosses et à partir de 36 heures toutes les cellules sont bourrées de gouttes noires (*voir figure 11 b.*).

La nystatine semble donc provoquer dans les cellules une véritable dégénérescence graisseuse.

7. LES PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides peuvent être mis en évidence soit par une coloration générale, soit par la démonstration de lipides non saturés, soit par les produits de leur hydrolyse.

a) Coloration générale

Celle-ci a été réalisée par la méthode suivante : fixation au formol-calcium suivie de postchromisation à 60°C dans le bichromate-calcium telle que l'indique Baker [Pearse p.313 (59)], puis coloration par le Sudan noir dissous dans du propylène glycol.

Les phospholipides sont bleu-gris sur fond jaune. La présence de nystatine n'affecte les phospholipides qu'à la 44e heure par suite de la vacuolisation du cytoplasme et de la mort des cellules qui s'arrondissent.

Leur répartition différente est donc due à un phé-

nomène secondaire de l'action de la nystatine.

b) Lipides non saturés.

Ces derniers peuvent être mis en évidence par la méthode que Lison appelle la réaction O^2 Schiff [p.753 (51)].

Nous avons obtenu par cette technique une coloration du cytoplasme localisée comme dans le cas des phospholipides. Mais les lames-contrôles, placées une nuit dans l'eau bouillie, se colorent de la même façon. Nous ne pouvons donc conclure à la présence de lipides à doubles liaisons conjuguées.

c) Produits d'hydrolyse.

Les produits d'hydrolyse des phospholipides sont des alcools, des acides gras, des acides aminés, de l'acide phosphorique.

Nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants, sauf dans le cas du plasmalogène et de la choline :

d) Le plasmalogène.

Il peut être mis en évidence par la réaction plasmale de Feulgen et Voit.

Après une hydrolyse très courte par le sublimé de ce phospholipide, il y a libération d'un alcool et d'un aldéhyde lequel est révélé par la coloration rouge du réactif de Schiff. Nous avons suivi la méthode indiquée par Lison [p.753 (51)].

Résultats

Toutes les cellules donnent une réaction plasmale positive, localisée dans le cytoplasme, surtout près du noyau et caractérisée par une coloration mauve. Parfois des inclusions mauves se trouvent dans le cytoplasme. Les noyaux sont incolores. Le cytoplasme des cellules en mitose est très coloré ; les cellules mortes également.

Si les lames sont placées directement dans le réactif de Schiff, les cellules ne sont pas colorées.

Un traitement d'une heure à la température ordinaire par l'hydroxylamine rend la réaction plasmale négative.

En présence de la nystatine, les cellules offrent la même distribution de la coloration que les cellules-témoins. Vers la 36^e heure, la répartition change ; la coloration est positive autour des vacuoles cytoplasmiques. A 72 heures, seules les cellules mortes, très nombreuses, sont colorées.

Le plasmalogène se concentre dans le cytoplasme des cellules mortes. La nystatine ne semble pas avoir d'action sur lui.

e) Réaction à l'acide phosphomolybdique

Chargaff et Levine (50) ont mis au point une technique chromatographique pour évaluer la choline et ses esters à partir des phospholipides. Ils hydrolysent les phospholipides et en extraient les acides gras en les traitant à chaud avec un mélange d'acide chlorhydrique normal et de méthanol. La choline libérée est transformée en molybdate de choline qui est colorée en bleu par le chlorure stanneux.

Gurr [p.440 (31)] et Pearse [p.851 (59)] indiquent cette technique adaptée pour l'étude histochimique par Landing et coll. (47). C'est celle que nous avons employée, car la réaction à l'iode ioduré est restée négative.

Résultats

Au bout de cinq heures d'expérience, toutes les lames présentent une réaction positive, mettant en évidence la même distribution de la choline : le cytoplasme, la membrane nucléaire, le noyau et surtout les nucléoles, sont colorés en bleu. Pendant la mitose, les chromosomes sont très bleus (*voir figure 12 a*).

Après 21 heures de contact avec la nystatine, la vacuolisation du cytoplasme des cellules est visible par la coloration bleue du réseau cytoplasmique autour des vacuoles incolores. De nombreux nucléoles bleus s'arrondissent.

Avec le temps, le réseau devient de plus en plus lâche et à 72 heures le cytoplasme est incolore, exception faite de la présence de quelques filaments bleus, les nucléoles sont bleu pâle ou ne sont plus visibles (voir figure 12 b.).

Nous pensons que cette réaction n'indique pas la présence de la choline liée aux lipides, mais la présence de la choline libre.

D'une part, la choline est distribuée dans toute la cellule ; les phospholipides ne le sont pas. D'autre part, un traitement par la pyridine de 18 h. à 60°C qui doit provoquer l'extraction de tous les lipides, ne modifie en aucune façon la coloration. Enfin, en cours d'application de la technique histochimique dont il s'agit, il ne se produit pas d'hydrolyse de phospholipides, ni par conséquent de libération de choline.

8. LES PHOSPHATASES ALCALINES

Nous avons suivi la méthode de Gomori, telle qu'elle est exposée dans l'ouvrage de Lison [p.756 (51)] ; mais en remplaçant le tampon phosphate par du Tris à la concentration finale à 0,04 M.

Cette technique, basée sur l'hydrolyse du glycérophosphate de sodium à pH 9,2 n'est pas spécifique d'une phosphatase déterminée ; ainsi l'ATPase, la Thiamine-pyrophosphatase, la glucose 6 phosphatase donnent une réaction positive avec ce substrat.

Résultats

Les cellules non fixées, observées après une heure d'incubation à 37°C, présentent la réaction positive suivante : les membranes cellulaires sont marquées par

une ligne noire (*voir figure 13 a.*). A un plus fort grossissement, on voit que cette ligne est formée de grains noirs, plus ou moins réguliers et juxtaposés.

Les membranes des cellules en mitose sont toujours fortement marquées, alors que la répartition de cette réaction parmi les autres cellules est inégale. Parfois un seul côté d'une cellule présente cette ligne noire.

Il faut noter aussi que lorsque des cellules ont quitté la surface du verre, leur emplacement reste visible, grâce à la présence de précipité noir à l'endroit où se trouvait la membrane cellulaire. Il y a donc diffusion de l'enzyme en dehors de la cellule. Tout ceci correspond aux observations faites par Gropp et coll. (30) (29).

Les lames de contrôle, incubées dans un milieu privé de glycérophosphate de sodium, sont uniformément colorées en jaune brun ou gris pâle.

Après cinq heures de contact avec la nystatine, de nombreuses cellules ont une membrane marquée par une large bande de précipité noir, irrégulière et formée de grains plus gros que ceux des cellules-témoins (*voir figure 13 b.*). Les cellules mortes sont entièrement couvertes de ce précipité noir.

Le phénomène s'accroît jusqu'à 44 heures. De nombreux noyaux ont un nucléole rond, noir et une membrane également noire. Après 72 heures les lames ne présentent plus que quelques cellules couvertes de granulations noires, encore attachées au verre.

Il semble donc que la phosphatase alcaline diffuse en dehors de la cellule, qu'elle est mise en évidence au niveau de la membrane cellulaire et qu'en présence de la nystatine son activité et sa diffusion augmentent.

9. LES PHOSPHATASES ACIDES

La méthode de Gomori [Lison p.758 (51)] fut aussi utilisée. Nous avons fixé les cellules au formol neutre salé et ajusté le pH du milieu d'incubation à 4,8 avec un tampon acétate.

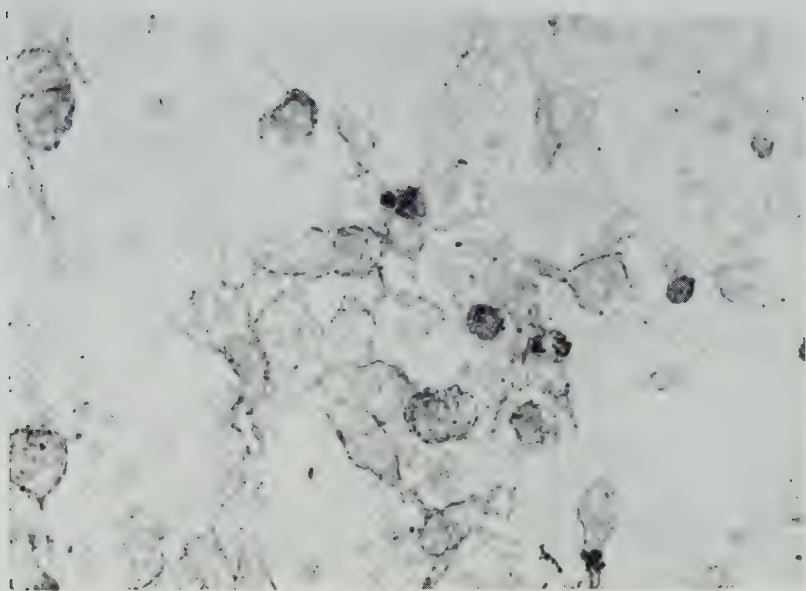


Figure 13 a - Activité de la phosphatase alcaline.
Cellules témoins. 260 X.

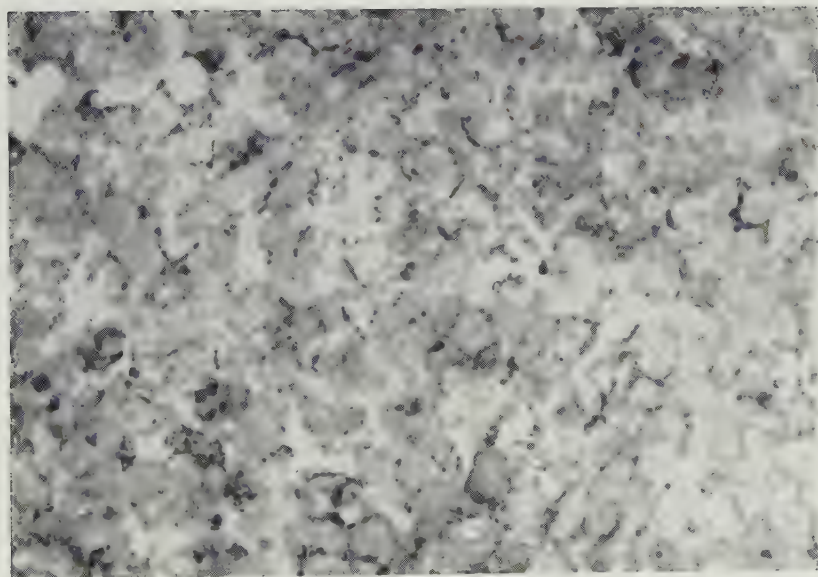


Figure 13 b - Activité de la phosphatase alcaline.
Cellules, mises 21 heures en présence de nystatine. 260 X.



Figure 14 a - Activité de la phosphatase acide.
Cellules témoins. 260 X.

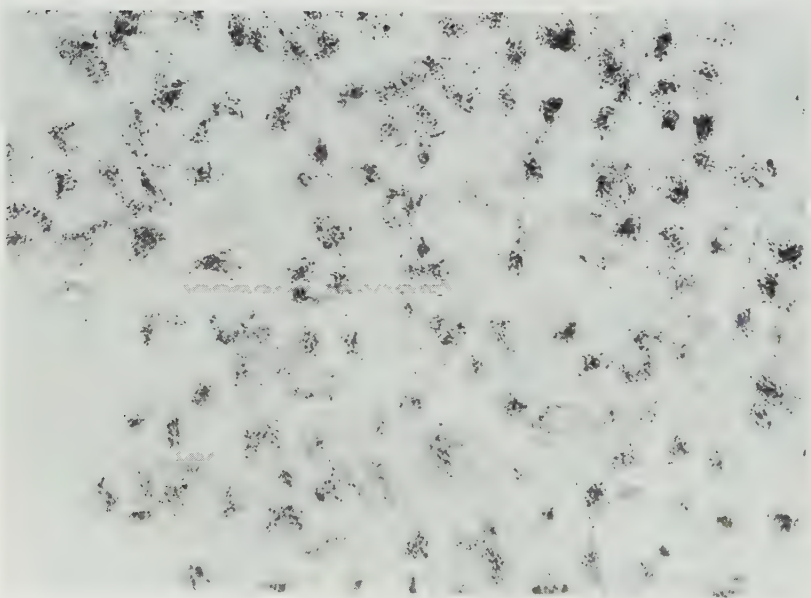


Figure 14 b - Activité de la phosphatase acide.
Cellules, mises 5 heures en présence de nystatine. 260 X.



Figure 15 a - Activité des déshydrogénases endogènes.
Cellules témoins, 610 X.

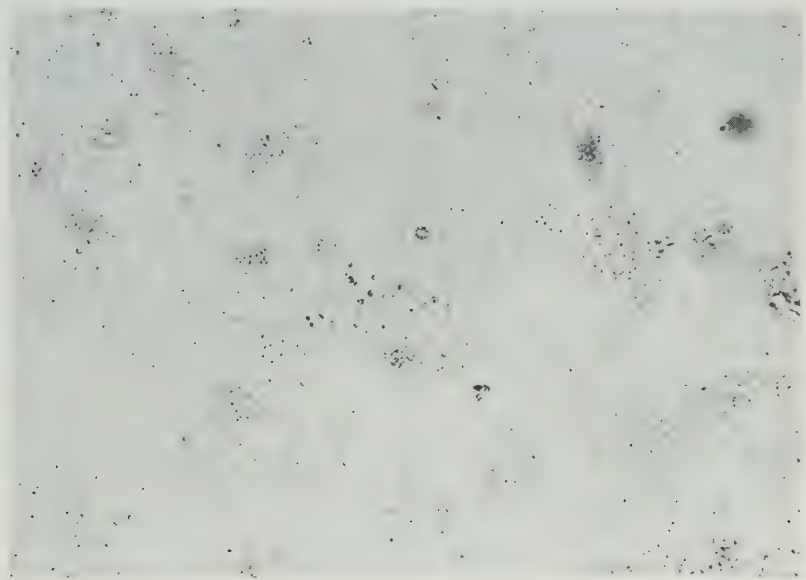


Figure 15 b - Activité des déshydrogénases endogènes.
Cellules, mises 5 heures en présence de nystatine. 610 X.

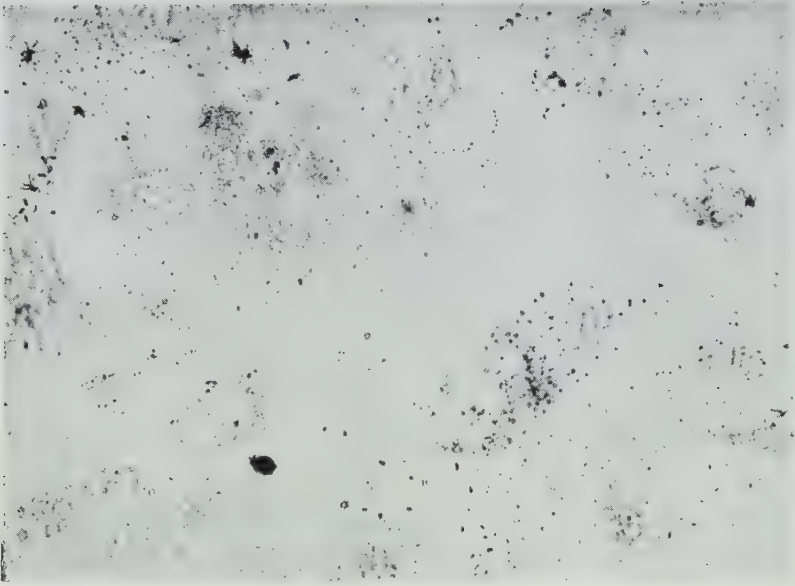


Figure 15 c - Activité des déshydrogénases en présence de succinate.
Cellules témoins. 610 X.

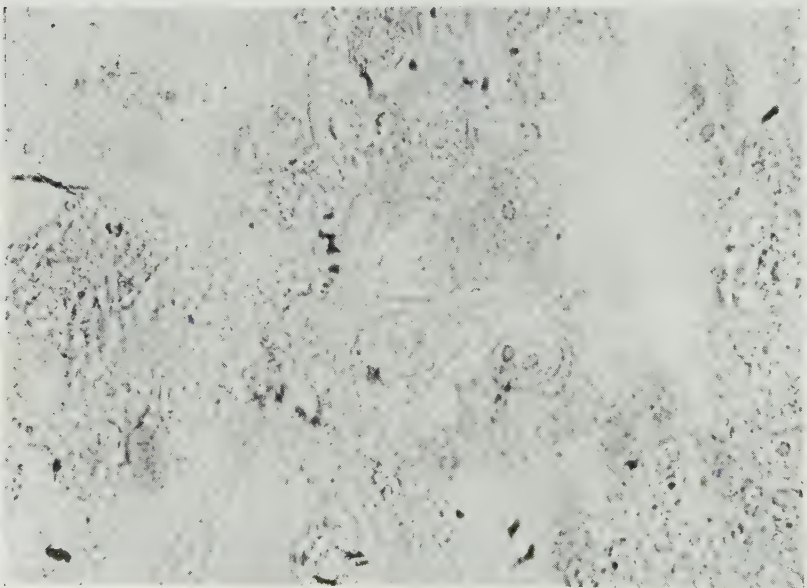


Figure 15 d - Activité des déshydrogénases en présence de succinate.
Cellules, mises 40 heures en présence de nystatine. 610 X.

Résultats

Le cytoplasme et les noyaux sont colorés uniformément en jaune brun. Les cellules présentent en quantité variable des grains noirs, disséminés dans le cytoplasme. (voir figure 14 a.).

Après avoir ajouté du fluorure de sodium 0,03 % au bain d'incubation, on n'a pas observé de grains noirs.

Il est à remarquer que les nucléoles des cellules non fixées présentent des grains noirs. Mais ceux-ci demeurant après incubation en présence du fluorure de sodium, ne sont pas considérés comme spécifiques de l'activité de la phosphatase acide.

Dès la 5^{ème} heure d'incubation avec la nystatine, les cellules présentent une quantité de grains bien supérieure à celle des cellules normales (voir figure 14 b.). On peut même voir parfois dans certaines cellules les vacuoles cytoplasmiques bordées de granulations noires.

Le nombre de grains augmente jusqu'à la 44^e heure ; puis à la 72^e heure, les quelques cellules mortes présentes sont bourrées de grains noirs.

Il se produit donc une forte stimulation de l'activité de la phosphatase acide en présence de la nystatine.

10. LA CYTOCHROME OXYDASE

Nous avons utilisé le réactif de "nadi" en suivant la technique indiquée par Burnstone (9). Les cellules ont été placées dans un milieu contenant 10 mgr de diméthylparaphénylènediamine et 10 mgr d' α -naphtol dans 50 ml de tris à pH 7,4. Après une incubation de 5 minutes à 37°C, les lames ont été examinées au microscope dans la solution de tris sans réactif.

Résultats

La réaction positive est caractérisée par une coloration bleue du cytoplasme. Cette coloration est irrég-

gulière parmi les cellules ; mais les cellules en mitose sont toujours bleues.

La présence de cyanure de potassium (0,001 M) dans le milieu d'incubation inhibe complètement la coloration.

Les cellules, mises en présence de nystatine pendant 5 heures, ne sont pas colorées. Le grand nombre de gouttelettes graisseuses qui se colorent plus ou moins par le "nadi", gêne l'interprétation des résultats après une incubation plus longue. La granulation due à l'enzyme se confond avec les gouttes de graisse colorées.

La cytochrome-oxydase paraît donc entièrement inhibée après quelques heures d'incubation des cellules en présence de la nystatine.

11. LES DESHYDROGENASES

Un certain nombre de déshydrogénases peuvent être actuellement mises en évidence par incubation des cellules en présence d'un substrat approprié.

Seligman et Rutenburg (72) sont les auteurs de la méthode de réduction des sels de tétrazolium. Nous avons choisi le Nitro BT en raison de sa grande sensibilité et de son insolubilité dans les graisses. Les détails de la technique sont exposés dans l'ouvrage de Pearse [p.910 (59)].

Résultats

Une incubation de 30 minutes à 37°C, en présence de succinate, a donné des résultats satisfaisants et fait apparaître de nombreux grains noirs à reflets rouges, dispersés de façon homogène dans le cytoplasme (*voir figure 15 a.*). Ni leur taille, ni leur forme ne sont très uniformes. Il se peut que le pH de 7,4 employé ne maintienne pas l'intégrité des mitochondries et que, dans ce cas (succino-déshydrogénase) (*voir figure 15 c.*), la présence de quelques grains plus gros puisse s'expliquer par l'augmentation de volume de quelques mitochondries. De plus, toutes les cellules n'ont pas la même activité.

Lorsque, pour contrôler la spécificité de la réaction, nous avons supprimé le succinate de sodium, nous avons aussi observé une activité importante.

Pensant que cette réaction positive pouvait être due à la "nothing dehydrogenase" de Racker (66), nous avons fait incuber les cellules dans un milieu avec et sans succinate ajusté à pH 6,5. En présence de succinate, nous avons obtenu la coloration de filaments mitochondriaux avec un ou deux grains noirs à l'extrémité des filaments. En l'absence de succinate, tous les grains sont ronds.

Nous avons alors utilisé l'action de différents inhibiteurs des déshydrogénases.

Le fluorure de sodium, l'arséniate de sodium, l'arsénite de sodium, l'iodoacétate ont été employés à la concentration de 0,01 M. Tenant compte de ce qu'un excès de pyruvate inhibe la déshydrogénase lactique, nous l'avons également utilisé à la concentration de 0,011 M.

Une incubation de 30 minutes dans les inhibiteurs (tamponnés par du tris), puis de 30 minutes à 37°C dans le milieu contenant le colorant et l'inhibiteur, n'a fourni aucune indication sur la nature de la déshydrogénase. Seul, le cyanure de potassium ajouté au milieu à la concentration de 0,001 M inhibe presque totalement la réaction.

On doit à Rutenburg et coll, (68) la constatation d'une réaction positive non spécifique de nombreux tissus normaux et cancéreux.

La nystatine, après 5 heures, provoque une forte stimulation de l'activité de ces réductases endogènes (voir figure 15 b.). Mais alors que, vers la 20^e heure, les cellules ont une activité moindre qu'au début de l'expérience, sous l'action de la nystatine, les cellules conservent une forte activité.

Après 44 heures, ces enzymes n'ont plus qu'une faible activité. Cet effet inhibiteur est plus nettement mis en évidence dans le cas de cellules incubées en présence de succinate (voir figure 15 d.).

Il semblerait donc que la nystatine stimule l'activité des déshydrogénases cellulaires pour l'inhiber ensuite vers la 40e heure ; ceci correspond à l'action de la nystatine sur les oxydations cellulaires.

V - ACTION DE LA NYSTATINE SUR LE METABOLISME DES GLUCIDES

Utilisée en dose toxique pour les cellules animales, la nystatine stimule les oxydations cellulaires, la consommation de glucose avec production parallèle d'acide lactique, puis inhibe en même temps la consommation d'oxygène et de glucose.

Le catabolisme du glucose pour la plupart des cellules animales peut se faire soit par le processus de Emden-Meyerhof, soit par la dégradation en pentose. Ce dernier processus étant rarement observé dans les tissus cancéreux [Wenner (82)] et mal déterminé dans les cellules normales [Beck (3)], nous ne l'avons pas étudié.

La nystatine agissant sur le métabolisme glucidique des cellules, nous allons en envisager les divers stades et tenter de délimiter les lieux d'action possible.

Pour cela, nous pouvons en ajoutant au milieu de culture des cellules, des substances chimiques déterminées (tous les produits de dégradation du glucose et les enzymes ont été achetés à la Cie Mann, à New-York, USA), découvrir des agents inhibant l'effet toxique de la nystatine ou des substances agissant de façon semblable à la nystatine.

Leur effet sur la consommation d'oxygène est suivi par les mesures faites avec l'appareil de Warburg ; des colorations permettent de contrôler le développement des changements histologiques ; enfin des dosages permettent de contrôler les variations de production d'acide lactique par rapport aux cellules-témoins.

A - ACTION PARALLELE DE CERTAINS POISONS

1. LE 2.4 DINITROPHENOL

Le dinitrophénol (DNP) a été utilisé en dissolution

dans un tampon phosphaté à pH 7.

Nous remarquons sur les courbes de la figure 16 qu'aux fortes concentrations (10^{-8} M) il y a inhibition totale de la respiration ; à la concentration de 10^{-4} M, le DNP active la respiration des cellules pour l'inhiber ensuite. Aux faibles concentrations (10^{-5} M et 10^{-6} M) il y a stimulation de la respiration. Ces courbes rappellent celles de l'action toxique de la nystatine sur les cellules.

Le tableau 10 permet de voir que le dinitrophénol, à la concentration de 10^{-4} M, et une concentration toxique de nystatine ont une action analogue non seulement sur la respiration des cellules, mais aussi sur leur activité glycolytique.

Mais la stimulation de la respiration par le dinitrophénol à la concentration de 10^{-4} M, qui est semblable à celle d'une concentration moyennement toxique de nystatine, n'est pas accompagnée comme pour cet antibiotique, d'un effet stimulant de la glycolyse.

Enfin lorsque le dinitrophénol et la nystatine sont ajoutés en même temps au milieu de culture, il y a action antagoniste des deux substances.

Plantefol (64) a démontré que le DNP, à un pH voisin de la neutralité et à une concentration donnée pour un système donné, augmente les oxydations cellulaires, que les cellules soient animales ou végétales.

Rohstein (67), étudiant l'effet du DNP sur les levures, a remarqué que, si aux faibles concentrations la respiration des levures augmente, aux fortes concentrations elle est inhibée et qu'en milieu anaréobie la glycolyse est stoppée.

On pense que le DNP constitue un agent d'activation de l'ATPase et des liaisons riches en énergie qui jouent un rôle dans le transport d'énergie des réactions d'oxydation aux réactions de phosphorylation. La stimulation de la respiration serait due d'après Fruton [p.385 (24)] au défaut d'influence régulatrice des groupements phosphoryles ou des substrats phosphorylés sur les oxydations.

TABLEAU 10

CONSUMMATION DE GLUCOSE ET PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR
LES CELLULES EN PRESENCE DES INHIBITEURS DE LA GLYCOLYSE

	Glucose consommé en mcg/ml		Acide lactique produit en mcg/ml	
	à 21 heures	à 72 heures	à 21 heures	à 72 heures
sans inhibiteur	272	388	150	390
+ Nystatine	276	376	315	560
2-4 dinitrophénol 10^4 M	400	676	435	630
2-4 dinitrophénol 10^4 M + nystatine	228	456	400	545
2-4 dinitrophénol 10^5 M	224	428	80	340
2-4 dinitrophénol 10^5 M + nystatine	220	452	270	630
Arséniate de sodium 0,0004 M	196	320	80	450
Arséniate de sodium 0,0004 M + nystatine	264	420	140	270
Fluorure de sodium 0,001 M	256	324	190	295
Fluorure de sodium 0,001 M + nystatine	352	592	100	635
Acide iodoacétique 10^5 M	208	388	40	200
Acide iodoacétique 10^{-5} M + nystatine	56	0	0	0

De plus il est admis que si le dinitrophénol stimule l'activité de l'ATPase mitochondriale et nucléolaire des cellules, les phosphatases alcalines et acides ne sont pas altérées [Vorbrodts (75)]. Il n'y a là aucune contradiction avec nos colorations histochimiques qui révèlent une grande activité des phosphatases en présence de nystatine.

Nous allons tenter de déterminer si l'addition d'ATP d'une part, et de phosphates ou de substances formant des complexes phosphorylés d'autre part, permet d'établir dans quelle mesure il y a similitude d'action du dinitrophénol et de la nystatine, comme le laissent suggérer les courbes de la figure 16.

2. L'ARSENATE DE SODIUM

Dissous dans l'eau, l'arsénate de sodium inhibe la respiration des cellules au milieu desquelles il est versé. Les courbes de la figure 17 montrent qu'à la concentration de 0,004 M, la respiration est arrêtée vers la 26^e heure et qu'à la concentration de 0,0004 M, les oxydations cellulaires sont inhibées vers la 50^e heure. Mais si l'on ajoute en même temps dans le milieu de culture l'arsénate à 0,0004 M et la nystatine, on obtient une augmentation de l'effet toxique : la respiration est stoppée dès les premières heures.

D'autre part, si l'on évalue le glucose consommé et l'acide lactique produit par les cellules (tableau 10) on constate que la stimulation de la glycolyse due à la nystatine n'est pas modifiée par l'addition d'arsénate.

Or l'arsénate de sodium inhibe la conversion du glycéraldéhyde 3 phosphate en acide 1,3 diphosphoglycérique en entrant en concurrence avec le phosphate du milieu [Fruton et Simmonds, p. 326 (24)]

On doit envisager la possibilité d'une action similaire de l'arsénate et de la nystatine à ce point de la glycolyse.

3. LE FLUORURE DE SODIUM

A la concentration de 0,01 M, le fluorure de sodium est toxique pour les cellules ; il ne l'est plus à 0,001 M.

La respiration de cellules, placées ou non dans un milieu contenant de la nystatine, n'est pas modifiée par la présence de fluorure de sodium ajouté à la concentration de 0,001 M.

Le tableau 10 montre que ce poison n'a pas non plus d'action sur la glycolyse.

Le fluorure de sodium inhibe l'énolase, enzyme qui catalyse la formation d'acide phosphoénolpyruvique à partir d'acide phosphoglycérique, les phosphatases acides et en général les enzymes qui hydrolysent l'ATP [Fruton et Simmonds p.381 (24)].

Il semble donc que la nystatine n'agisse pas sur ces enzymes.

4. L'ACIDE IODOACETIQUE

Cet acide a été dissous dans l'eau, puis neutralisé à pH 7 par la soude N/10. Il est très toxique et inhibe la respiration des cellules en 18 heures lorsqu'il est utilisé à la concentration finale de 10^{-4} M, en 64 heures à la concentration de 10^{-5} M (figure 17).

Si l'on ajoute cet acide (10^{-5} M) au milieu contenant la nystatine, les cellules cessent de respirer dès la 4e heure d'expérience.

En présence d'iodoacétate, la production d'acide lactique par les cellules normales est fortement diminuée et la glycolyse des cellules intoxiquées par la nystatine est totalement inhibée (tableau 10).

Il est admis que l'acide iodoacétique se combine spécifiquement avec les groupes sulfhydryles et inhibe tout enzyme dont l'activité nécessite leur présence. Ainsi la glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase forme un complexe avec le DPN par l'intermédiaire de liaisons -S- [Krimsky et Racker (42)]. L'acétyl-coenzyme A qui joue un rôle primordial dans le métabolisme des

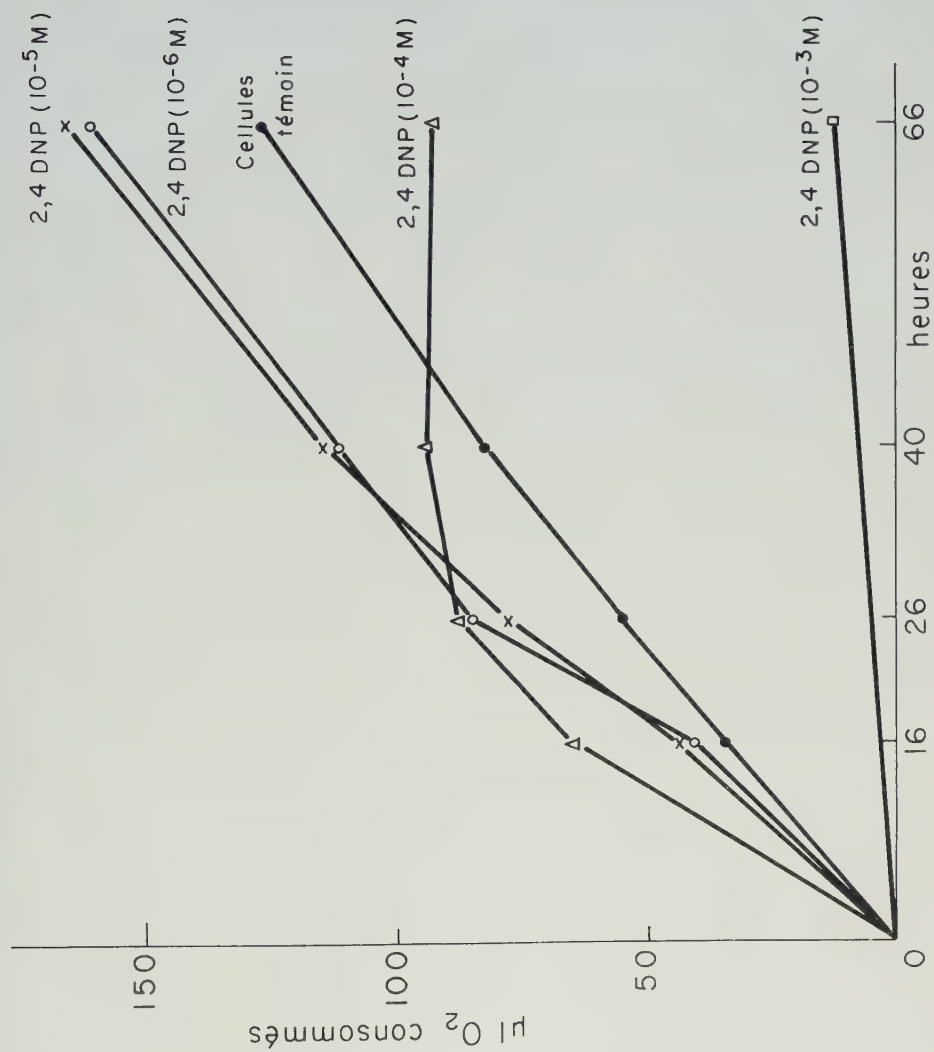


Figure 16 - Respiration des cellules en présence de différentes concentrations de 2-4 Dinitrophénol.

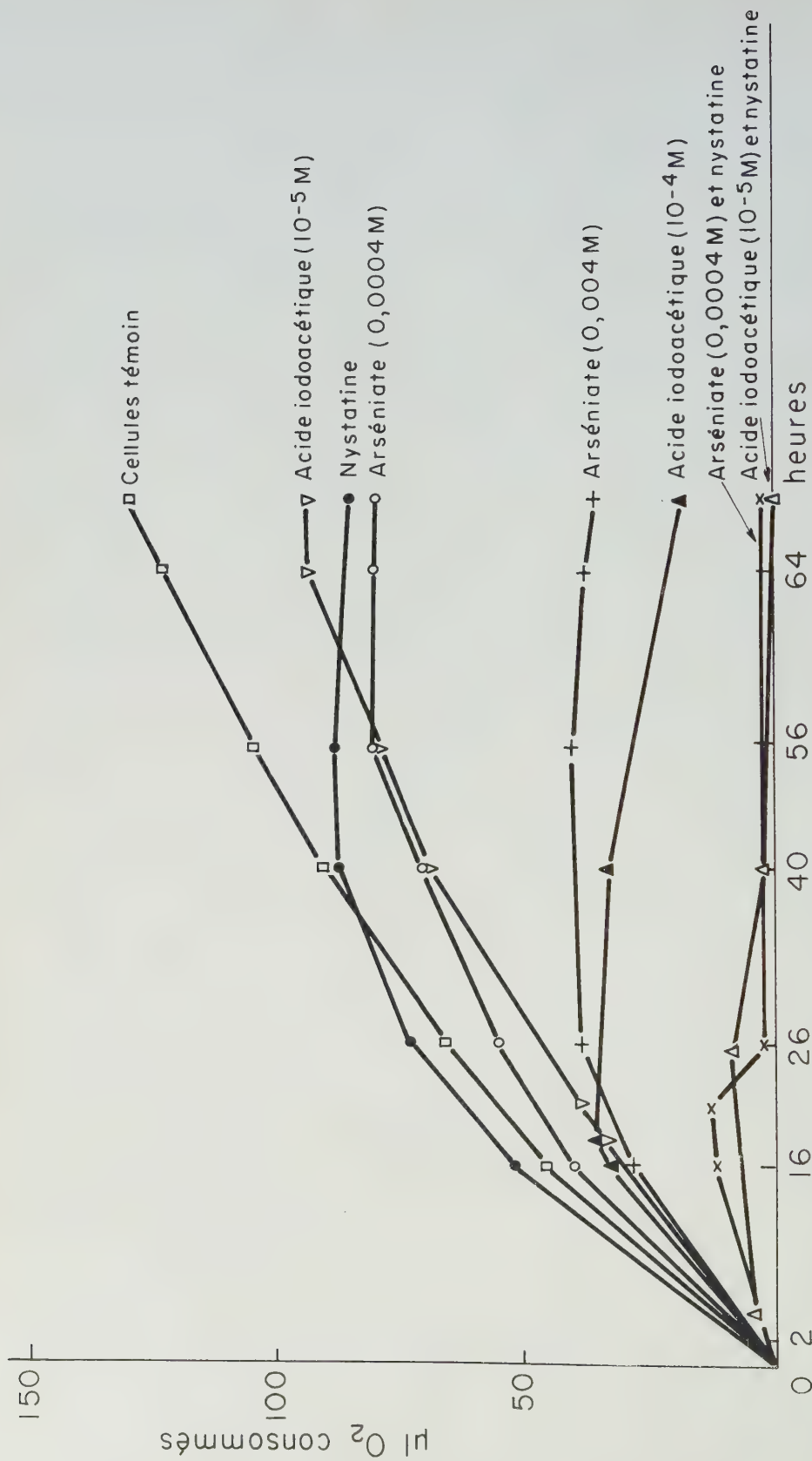


Figure 17 - Respiration des cellules en présence d'arséniate de sodium et de nystatine ou d'acide iodoacétique et de nystatine.

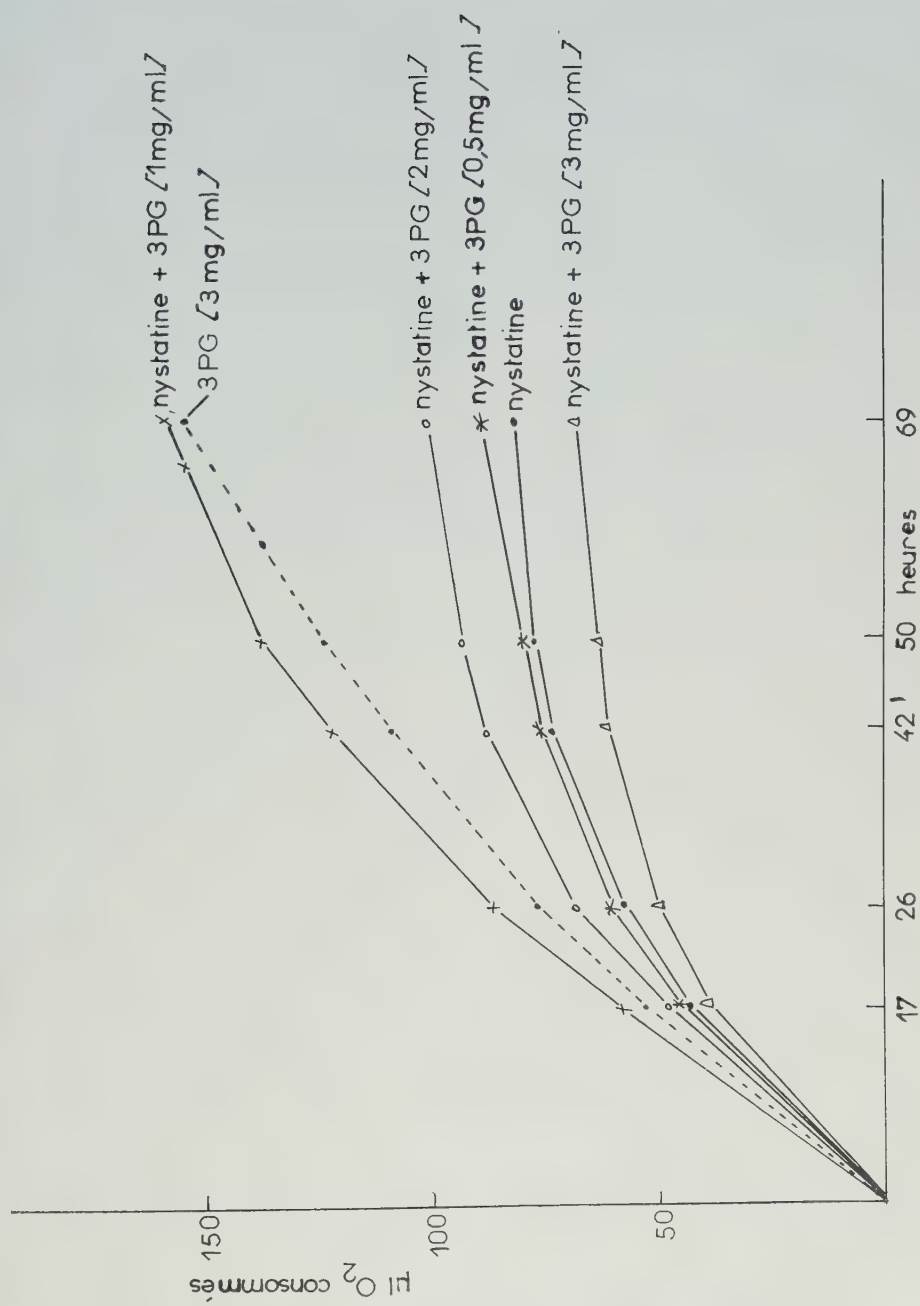


Figure 18 - Respiration des cellules en présence de nystatine et de 3-Phosphoglycéraldéhyde.

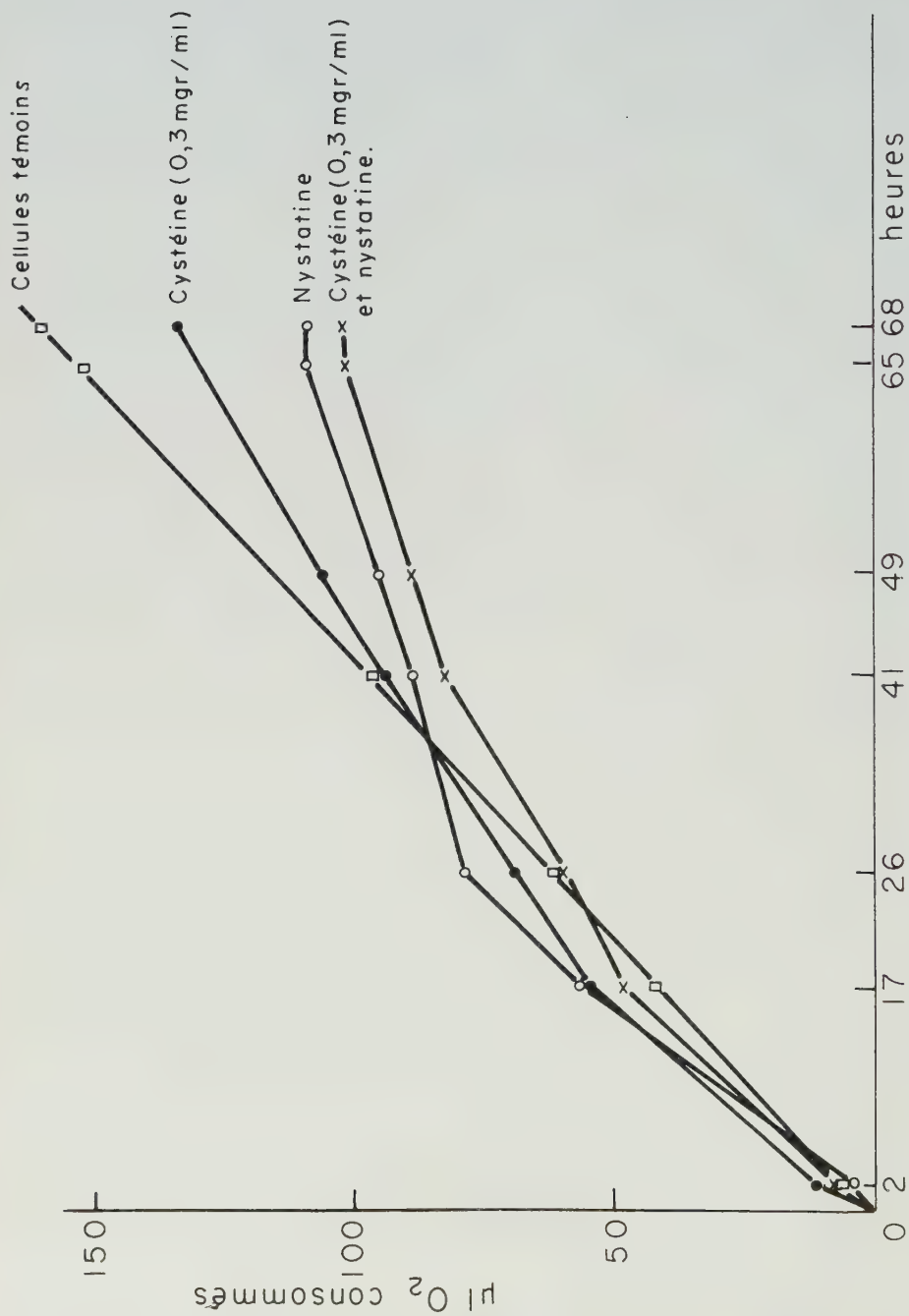


Figure 19 - Respiration des cellules en présence de nystatine et de cystéine.

lipides, dans l'incorporation de l'acide acétique dans le cycle de Krebs, est formé essentiellement à partir d'acide lipotique.

La présence simultanée d'acide iodoacétique et de nystatine a un effet synergique : la respiration et la glycolyse sont inhibées dès les premières heures de l'expérience.

B - ADDITION DES SUBSTRATS DE LA GLYCOLYSE

1. GLUCOSE

Le glucose a été dissous dans l'eau distillée et ajouté au milieu de culture à la concentration de 1 mgr par ml.

Nous avons constaté, grâce aux mesures biochimiques ci-dessus exposées (Chap.III C 2 e) que le glucose est rapidement utilisé jusque vers la 30e heure. Grâce aux méthodes histochimiques, nous savons que les réserves de glycogène de la cellule sont vite épuisées et ne se reconstituent plus. Et les expériences, faites à l'appareil de Warburg, ont révélé que l'addition de glucose au début ou en cours d'expérience (à 21 et à 30 heures) ne modifie en rien l'effet toxique de la nystatine sur la respiration des cellules.

Le métabolisme glucidique n'est donc pas inhibé au niveau du glucose.

2. LE PYRUVATE

A la concentration de 1 mgr par ml, l'addition de pyruvate de sodium ne modifie en rien l'évolution de l'effet toxique de la nystatine : même courbe de respiration, même morphologie cellulaire, même pH que les cellules-témoins.

La nystatine n'agit donc pas au niveau de l'acide

pyruvique qui est le substrat-clef nécessaire à la formation d'innombrables produits de synthèse dans le métabolisme cellulaire.

3. LES ACIDES DU CYCLE DE KREBS

Tous ces acides ou leur sel de sodium ont été dissous dans l'eau distillée tamponnée par du tris (0,2 M), gardés en glacière à + 4°C et utilisés à la concentration finale de 0,01 M sauf l'acide citrique à 0,003 M.

L'addition de succinate stimule nettement la respiration des cellules normales mais aucun de ces substrats ne modifie la courbe respiratoire des cellules en présence de la nystatine.

Les milieux de culture des cellules cultivées en présence de nystatine avec ou sans addition des acides du cycle de Krebs, acidifient le milieu de culture de la même façon.

A partir de 21 heures, la vacuolisation des cellules avec leurs nucléoles arrondis, l'augmentation du nombre de cellules mortes, progresse aussi de la même façon.

Le cycle de Krebs ne semble donc pas être touché directement par l'action toxique de la nystatine.

4. LE 3 PHOSPHOGLYCERALDEHYDE

Ce triose, trouvé dans le commerce sous la forme stable d'un sel de baryum, a été transformé en sel de potassium, non toxique pour les cellules, selon la méthode indiquée par Pearse [p. 879 (59)].

Ajouté au milieu à la concentration de 3 mgr par ml, ce sucre ne modifie pas la courbe respiratoire des cellules ; mais ajouté à des concentrations variables en présence de nystatine, nous avons obtenu un effet antagoniste (figure 18) : à la concentration de 1000 mcg par ml, l'effet toxique de la nystatine sur la respiration est annulé pendant 70 heures d'expérience.

TABLEAU I I

**CONSUMMATION DE GLUCOSE ET PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE
PAR LES CELLULES EN PRESENCE DE NYSTATINE ET DE DEUX
SUBSTRATS DE LA GLYCOLYSE**

Substrats ajoutés aux cellules	Glucose consommé en mcg/ml	Acide lactique produit en mcg/ml
<i>Expérience de 69 heures</i>		
3 PG* (3 mgr/ml)		730
Nystatine (750 mcg/ml)		315
" + 3 PG* (3 mg/ml)		355
" + 3 PG* (2 mg/ml)		520
" + 3 PG* (1 mg/ml)		415
Nystatine (500 mcg/ml)		290
" + 3 PG* (2 mg/ml)		660
" + 3 PG* (1 mg/ml)		485
<i>Expérience de 71 heures</i>		
Témoins	632	415
Acide 3 PG* (3 mg/ml)	664	385
Nystatine (750 mcg/ml)	752	600
" + Ac. 3 PG* (3 mg)	580	530

* 3 PG = 3 phosphoglyceraldéhyde.

AC. 3 PG = Acide 3 phosphoglycérique.

Le tableau 11 montre que la production d'acide lactique, inhibée par la nystatine, se poursuit si l'on ajoute du 3 phosphoglycéraldéhyde et est d'autant plus importante que la concentration de ce substrat est plus grande.

Ce substrat empêche donc, dans une certaine mesure, l'effet toxique de la nystatine. Cette action antagoniste variant en fonction des concentrations mises en présence, il existe peut-être une compétition pour la 3 phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase entre ces deux substances.

5. L'ACIDE 3 PHOSPHOGLYCERIQUE

Avant utilisation, nous avons aussi transformé le sel de baryum de cet acide en sel de potassium.

Introduit à la concentration de 3 mgr. par ml, l'acide 3 phosphoglycérique n'empêche pas l'inhibition de la respiration des cellules par la nystatine. La production d'acide lactique (tableau 11) est un peu diminuée, peut-être par inhibition de l'effet premier stimulant de la nystatine sur la glycolyse.

C - ADDITION DE COFACTEURS DE LA GLYCOLYSE

1. LE PYRIDOXAL PHOSPHATE

Cette vitamine n'est pas toxique pour les cellules. Utilisée à la concentration de 0,01 %, elle n'a qu'un faible effet d'accélération de l'apparition de l'effet toxique de la nystatine.

L'activité de nombreux enzymes, tels que les décarboxylases, les désulphydrases, dépendent de leur activation par le pyridoxal. Ce produit entre également dans la composition des phosphorylases.

Ainsi, l'effet toxique de la nystatine n'est-il

pas dû à une inactivation de cette vitamine.

2. LA RIBOFLAVINE

À la concentration de 1 mgr par ml de milieu, la riboflavine n'a aucune action sur la respiration des cellules mises en présence de nystatine.

Warburg et Christian (80) ont démontré l'importance de la riboflavine (ferment jaune) dans l'oxydation du glucose 6 phosphate par l'oxygène ou en milieu anaérobie par le bleu de méthylène.

Cette lactoflavine, si importante qu'elle soit dans les phénomènes d'oxydo-réduction, ne modifie pas l'action de la nystatine sur les cellules.

3. L'ADENOSINE TRI ET DI PHOSPHATE.

L'adénosine tri-phosphate ou ATP et l'adénosine di-phosphate ou ADP ont été ajoutés au milieu à la concentration finale de 0,005 M. L'ADP possède une action stimulante sur les cellules normales ; mais, pas plus que l'ATP, elle n'a d'influence sur l'action de la nystatine.

Si, de même que le dinitrophénol, la nystatine stimule l'activité de l'ATPase, l'ADP et les ions phosphates se trouvent en excès dans le milieu.

Nous avons vu que l'ADP augmente les oxydations cellulaires ; c'est peut-être ce qui pourra permettre d'expliquer l'effet stimulant de la nystatine sur la respiration.

4. LES PHOSPHATES

L'addition d'un tampon phosphate (M/150) n'a aucun effet sur les cellules normales ; mais, ajouté en même temps que la nystatine, le tampon phosphate rend critique l'état des cellules qui cessent de respirer dès

la 16ème heure. Nous avons montré que le même phénomène se produit avec l'arséniate (*Cf fig. 17*).

Si l'hydrolyse de l'ATP est accélérée par la nystatine, la libération des ions phosphate peut aggraver l'effet toxique de cet antibiotique.

5. LA CYSTEINE

Cet acide aminé, indispensable à la croissance des cellules, joue un rôle prépondérant dans les phénomènes d'oxydo-réduction. Il active de nombreux enzymes comme la phosphoglucomutase et la glycéraldéhyde 3 phostate déshydrogénase, et il rend inactifs certains antibiotiques comme, par exemple, la pénicilline [Cavallito et Bailey (10)].

A la concentration de 0,3 mgr par ml, la cystéine se montre toxique pour la respiration des cellules vers la 40e heure (*Fig.19*).

En présence de nystatine, la cystéine semble provoquer l'accélération de l'effet toxique et supprime l'effet stimulant de la nystatine sur la respiration pendant les premières heures.

De plus la cystéine inhibe la glycolyse ; mais alors que cet effet toxique n'est que passager à l'égard des cellules-témoins (*tableau 12*), en présence de nystatine, il se maintient jusqu'à la fin de l'expérience.

La cystéine paraît donc accentuer l'effet toxique de la nystatine sur les cellules.

Nous avons vu, grâce à la coloration histochimique (*Chap.IV, n°5*) que les groupes SH s'accumulaient dans les cellules dès la 21ème heure et n'étaient sans doute pas utilisés. Il est donc normal que l'addition de nystatine ne fasse qu'aggraver l'effet nocif de la nystatine.

6. LA COZYMASE I

La cozymase I ou DPN stimule la respiration des

T A B L E A U 1 2

**CONSUMMATION DE GLUCOSE ET PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE
DES CELLULES MISES EN PRESENCE DE NYSTATINE
ET DE CERTAINS COFACTEURS DE LA GLYCOLYSE**

COFACTEURS	Glucose consommé en mcg/ml		Acide lactique produit en mcg/ml	
	à 21 heures	à 72 heures	à 21 heures	à 72 heures
sans cofacteur	215	632	152	415
sans cofacteur + nystatine	225	588	345	465
Cystéine (0,3 mgr/ml)	156	404	25	350
Cystéine + nystatine	104	253	35	220
3 P G Dase* (0,02 mgr/ml)		380		540
3 P G Dase (0,02 mgr/ml) + nystatine		564		605

* 3 P G Dase = 3 phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase.

cellules normales à la concentration de 0,6 mM. Ajouté à cette concentration, le DPN n'a aucun effet sur la nystatine. De toutes façons, ce cofacteur, indispensable intermédiaire de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, doit se trouver en quantité par suite de l'excès d'acide lactique produit par les cellules.

7. LA COENZYME A

Nous avons vu, grâce aux méthodes histochimiques, que la nystatine produit dans les cellules une dégénérescence graisseuse.

La coenzyme A joue un rôle très important dans la synthèse des acides gras ; mais à la concentration de 0,6 mM, elle ne modifie en aucune façon l'action de la nystatine.

8. LA COCARBOXYLASE

On n'ignore pas que certains antibiotiques du groupe glucidique et les cyclines [Hernandez (36, 37)] en particulier, inactivent la cocarboxylase.

La nystatine n'a aucune action sur cet enzyme qui, employé à la concentration de 0,6 mM, ne retarde, ni n'annule son effet toxique.

9. LA 3 PHOSPHOGLYCERALDEHYDE DESHYDROGENASE

Cette déshydrogénase, à la concentration finale de 0,02 mgr par ml, n'est pas toxique pour les cellules ; elle augmente un peu la glycolyse des cellules. Ajouté au milieu en même temps que la nystatine, elle n'en modifie par l'action toxique sur la respiration, ni sur la glycolyse (tableau 12).

VI - ACTION TOXIQUE DE L'AMPHOTERICINE B SUR LES CELLULES ANIMALES

Nous avons vu au chapitre II paragraphe B-3, que les amphotéricines A et B sont, avec la nystatine, les antibiotiques antifongiques les plus satisfaisants au point de vue de l'utilisation dans les cultures de tissus *in vitro*.

Par leur faible solubilité dans l'eau, par leur structure de polyène, par l'absence d'halogène, de soufre, de groupes méthoxyles et acétyles dans leur molécule [Van deputte et coll. (74)], ces agents antifongiques se rapprochent.

Nous allons rechercher si ces propriétés se traduisent par un mode d'action toxique similaire.

L'amphotéricine B (*) a été mise en suspension directement dans l'eau ; par un titrage effectué ainsi qu'il a été indiqué ci-dessus (Chap. I 4), le point critique de toxicité pour ce lot est de 100 mcg par ml. La dose toxique, utilisée pour ces expériences, a été de 2000 mcg par ml.

1. MORPHOLOGIE DES CELLULES CULTIVEES EN PRESENCE D'AMPHOTERICINE B

Des cellules animales furent cultivées en présence d'une concentration toxique d'amphotéricine B.

A 24 heures d'intervalle, les cellules furent colorées à l'hémalum-éosine.

Après 21 heures, les cellules montrent une tendance des nucléoles à devenir uniques et ronds.

(*) Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à M. E. Drouhet, du Service de Mycologie et de Physiologie végétale de l'Institut Pasteur de nous avoir procuré ce précieux produit.

Au bout de 44 heures, une vacuolisation du cytoplasme apparaît.

A 72 heures, les vacuoles sont très nombreuses, larges et quantité d'entre elles sont remplies de cristaux jaunes d'amphotéricine B (Fig.20 b). On peut distinguer beaucoup de cellules rondes à noyaux pycnotiques, entourées d'un cytoplasme condensé.

A 92 heures, la plupart des cellules ont abandonné la surface du verre et celles qui y sont encore fixées, présentent des vacuoles remplies de cristaux.

Nous retrouvons ainsi un effet cytotoxique semblable à celui de la nystatine, à savoir que les nucléoles s'arrondissent, que la vacuolisation du cytoplasme entraîne une désorganisation complète de la cellule qui finit par mourir.

Il semble cependant que l'amphotéricine B peut s'accumuler sous forme de cristaux dans les vacuoles intracytoplasmiques et y persister assez longtemps sans entraîner la mort immédiate de la cellule.

Hunt W.H. (39) étudiant l'effet de cet antibiotique sur les animaux a découvert les dépôts cristallins jaunes incrustés à la surface du foie et de la rate.

2. METABOLISME RESPIRATOIRE ET GLUCIDIQUE

Les courbes (Fig.21) de respiration des cellules en présence de différentes concentrations d'amphotéricine B furent établies d'après les mesures faites avec l'appareil de Warburg (Chap.1-5)

Ces courbes ressemblent en tous points à celles qui furent obtenues avec la nystatine, exception faite de l'apparition plus tardive de l'effet toxique à la concentration de 2000 mcg par ml, - l'effet se produisant après 60 heures d'incubation.

A la dose moyennement toxique de 1 000 mcg par ml, il y a stimulation, puis inhibition de la respiration.

A la dose faiblement toxique de 200 mcg par ml, il

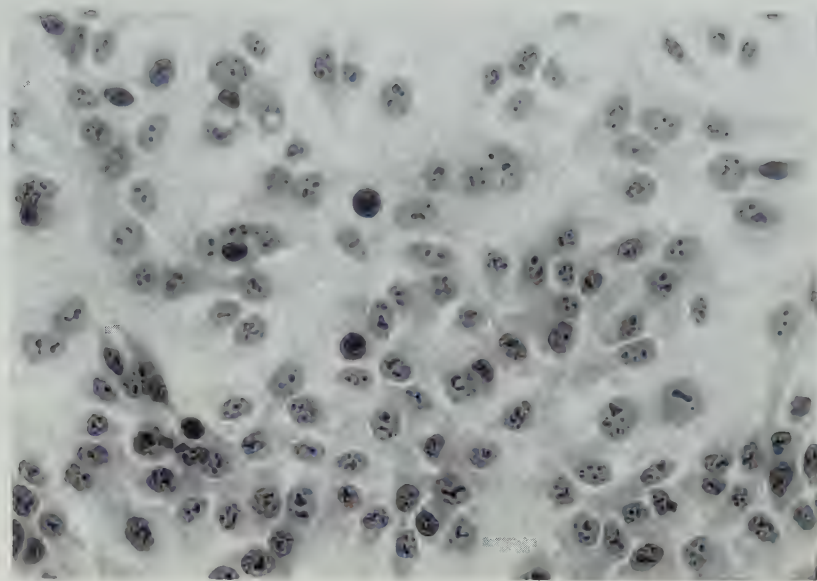


Figure 20 a - Cellules témoins. 260 X.

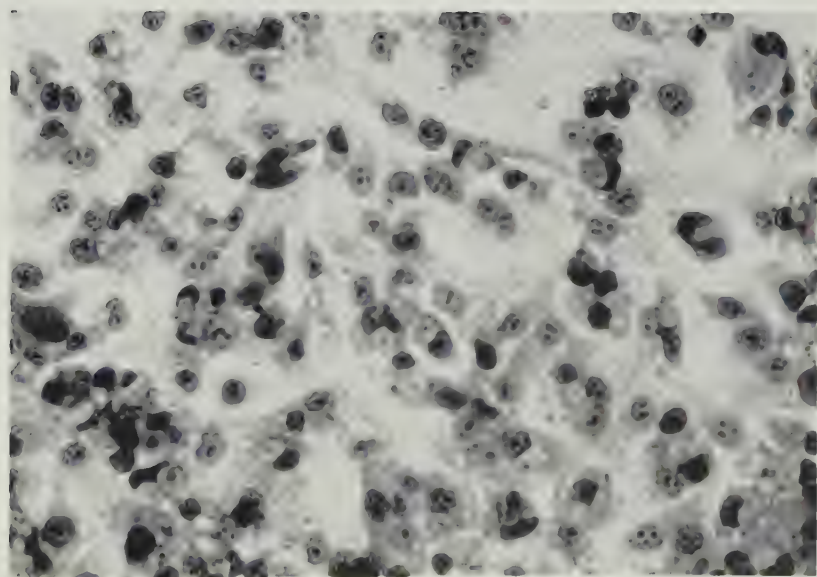


Figure 20 b. - Cellules, mises 72 heures en présence d'amphotéricine B. 260 X.

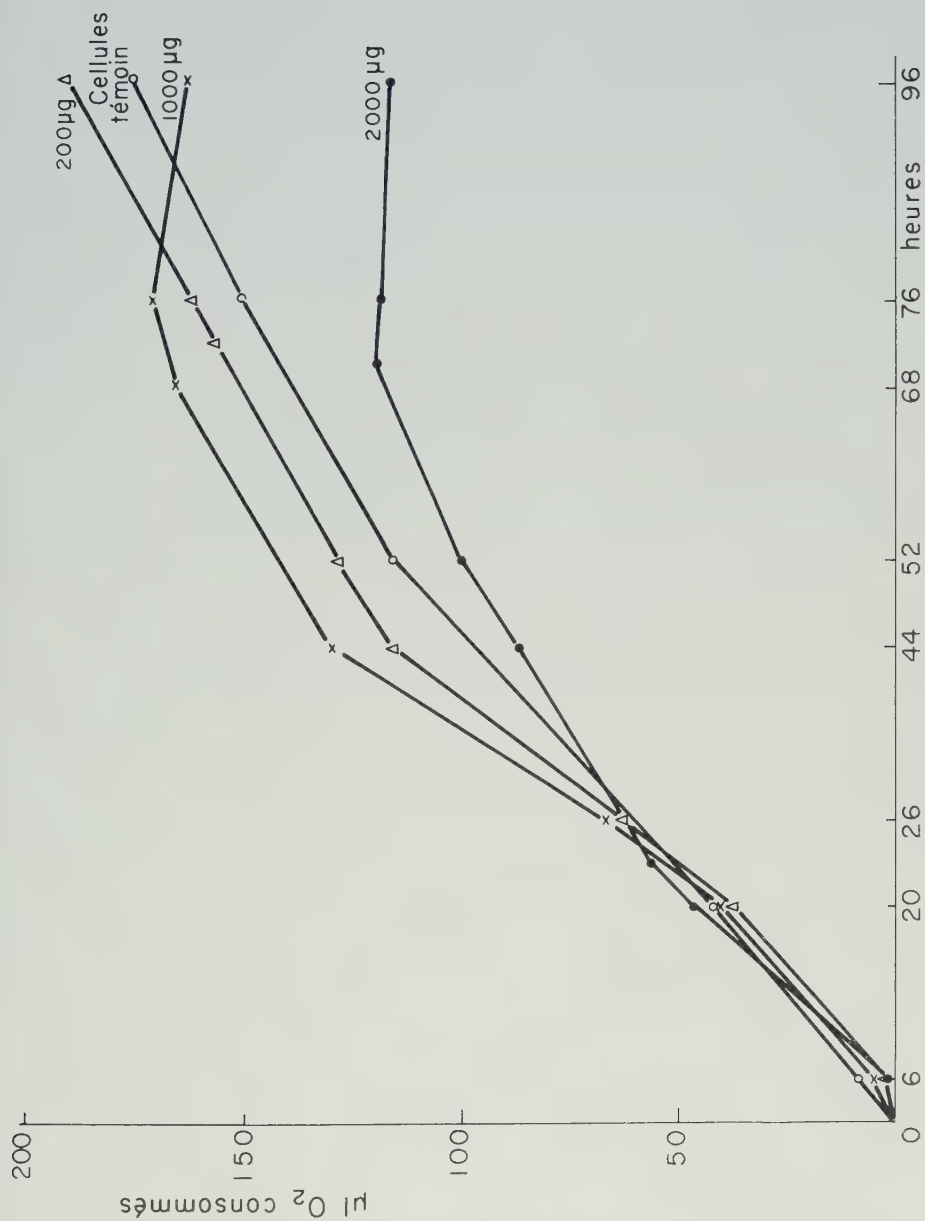


Figure 21 - Respiration des cellules animales en présence d'amphotéricine B.

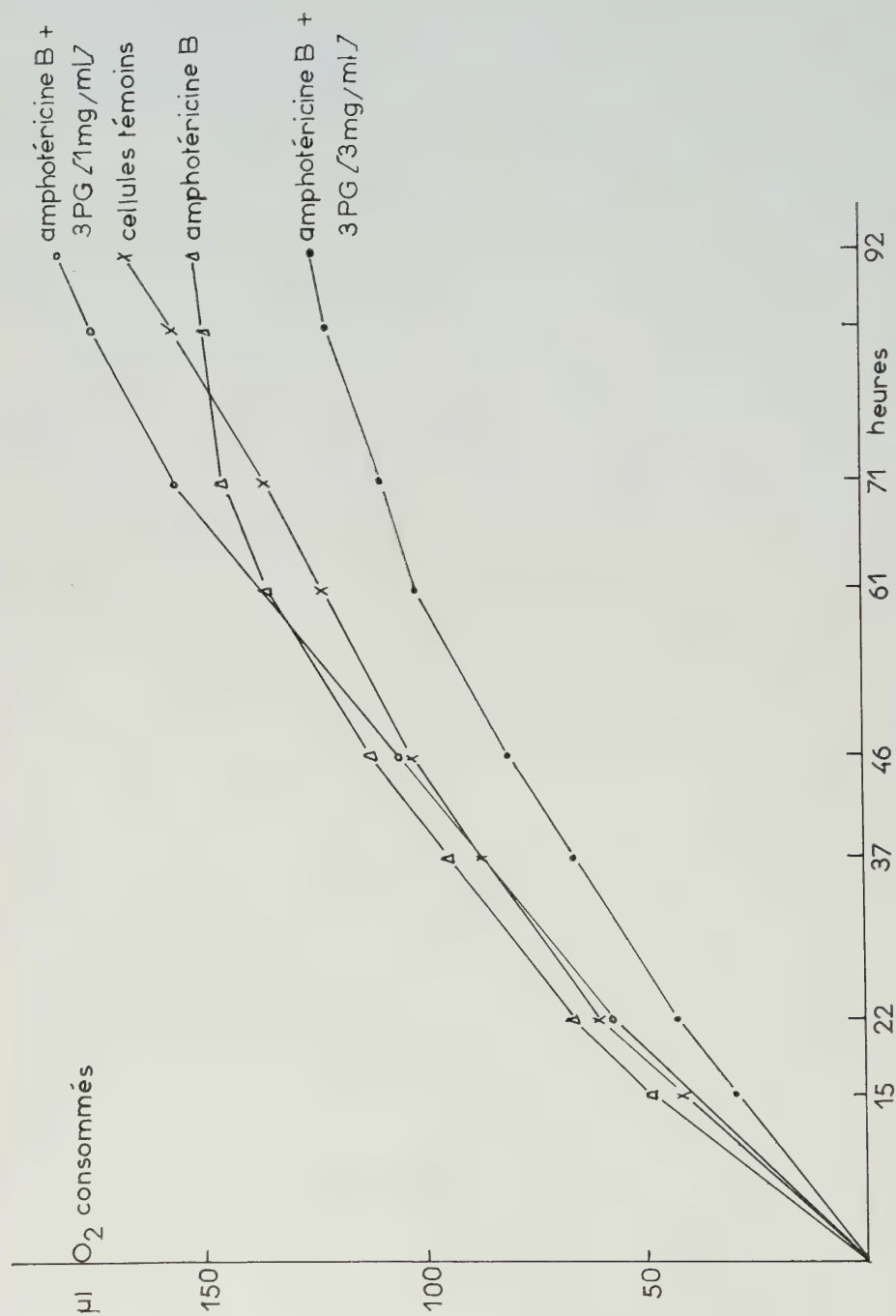


Figure 22 - Respiration des cellules en présence d'Amphotéricine B et de 3-Phosphoglycéraldéhyde.

y a initialement stimulation, puis parallélisme de la courbe avec celle des cellules-témoins.

Il reste à rechercher si l'inhibition de la respiration est accompagnée d'une action sur le métabolisme glucidique.

Les dosages ont été effectués, selon les techniques exposées au chapitre III.C.e, sur les surnageants récoltés à la fin des expériences à l'appareil de Warburg.

D'après le tableau 13, à la concentration de 200 mcg par ml, l'amphotéricine B n'a guère d'action sur la glycolyse. A la concentration moyennement toxique de 1 000 mcg par ml, l'activité glycolytique est nettement supérieure à celle des cellules-témoins. A la concentration toxique de 2 000 mcg par ml, cette activité est diminuée.

3. ACTION DU 3 PHOSPHOGLYCERALDEHYDE SUR L'EFFET TOXIQUE DE L'AMPHOTERICINE B.

Nous avons vu que l'addition de 3 phosphoglycéraldéhyde au milieu de culture de cellules, incubées en présence de nystatine, protégeait ces cellules contre l'action toxique de cet antibiotique.

La figure 22 montre que le même effet protecteur de la respiration est obtenu avec une concentration de ce triose de 1 mgr par ml, alors qu'une concentration plus forte (3 mgr par ml) ne l'est pas.

La glycolyse est d'autant plus grande que la concentration est plus forte.

T A B L E A U 1 3

**CONSUMMATION DE GLUCOSE ET PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE
PAR LES CELLULES MISES EN PRESENCE D'AMPHOTERICINE B**

Produits ajoutés aux cellules	Glucose consommé en mcg/ml	Acide lactique produit en mg/ml
<i>Expérience de 96 heures</i>		
Témoins	852	1070
Amphotéricine B (200 mcg/ml)	900	1020
" " (1000 " ")	928	1260
" " (2000 " ")	852	990
<i>Expérience de 92 heures</i>		
Témoins		600
3 P G* (3 mg/ml)		305
Amphotéricine B (3000 mcg/ml)		410
" + 3 PG* (3 mg/ml)		1060
" + 3 PG* (1 mg/ml)		530

* 3-phosphoglycéraldéhyde.

VII - DISCUSSION

En recherchant le meilleur produit antifongique à utiliser dans les milieux de culture de tissus *in vitro*, nous avons vu que la nystatine et les amphotéricines sont les plus efficaces.

Ces antibiotiques qui appartiennent au groupe des polyènes, qui sont peu solubles dans l'eau, se rapprochent encore plus par leur mode d'action toxique sur les cellules animales.

On sait en effet qu'ils pénètrent dans les cellules dont ils stimulent la respiration et le métabolisme glucidique avant de les inhiber de façon irréversible, - ce qui entraîne la désorganisation du cytoplasme et la mort des cellules.

En employant des méthodes histochimiques et physiologiques, nous avons tenté de pénétrer le secret du mécanisme de cette action toxique.

Toute réaction biochimique est liée à des échanges d'énergie. La dégradation du glucose est la source d'énergie la plus couramment utilisée. Toute synthèse de protéine, constituant un processus endergonique, puise son énergie dans des réactions exergoniques, le plus souvent des réactions d'oxydation.

Il s'ensuit que lorsque les oxydations cellulaires et la glycolyse se trouvent stoppées, la synthèse des protéines s'arrête et la mort survient. C'est ainsi que nous avons remarqué que les ribonucléoprotéines, colorées par la pyronine ou le bleu de toluidine, disparaissent graduellement du cytoplasme.

Avant de s'arrêter, la respiration des cellules apparaît d'abord stimulée, et cette stimulation atteint une ampleur et une durée d'autant moins importantes que la concentration d'antibiotique est plus forte. De même la glycolyse est tout d'abord stimulée et ceci quelle

que soit la concentration. Seule l'amplitude de la stimulation varie.

L'analogie des courbes de respiration cellulaire en présence de nystatine et de dinitrophénol, 2-4, fait entrevoir la possibilité d'un mode d'action semblable dans les deux cas.

Si, de même que le dinitrophénol, la nystatine provoque une augmentation de l'ATPase, elle doit modifier en même temps les réactions qui en dépendent.

Ainsi la stimulation de cette activité devrait pouvoir être mise en évidence par les méthodes histochimiques. Malheureusement, la méthode de Gomori localise cette activité au niveau de la membrane cellulaire. Wachstein et Meisel (76) ont, grâce à une méthode plus sensible, découvert que 5 enzymes différents peuvent hydrolyser l'ATP utilisé en tant que substrat. En l'état actuel de la recherche histochimique, il est donc difficile de conclure à la localisation de l'activité de l'ATPase.

Yoshida et Pomerat (8) ont remarqué qu'une forte concentration d'ATP modifie la morphologie des nucléoles lesquels deviennent denses et ronds. Nous avons également noté l'apparition de ce phénomène qui est probablement dû à une perturbation de l'activité ATPasique.

L'activité de la succinodéshydrogénase est également liée aux réactions d'oxydo-réduction ; fortement stimulée pendant les premières heures de contact avec la nystatine, elle disparaît au moment où la respiration est inhibée.

De plus l'ATPase hydrolyse l'ATP en ADP et acide phosphorique qui vont se trouver en excès. Or, d'une part, nous avons remarqué que l'addition d'ADP au milieu de culture, stimule la respiration des cellules normales, d'autre part, il est établi que l'ADP est le véritable substrat de la glycolyse et que les ions phosphates permettent la phosphorylation du glycogène des cellules et du glucose du milieu.

Une stimulation de l'activité de l'ATPase peut donc constituer l'explication de l'activation de l'assimila-

tion du glucose et sa dégradation. Nous avons d'ailleurs constaté que, dès la cinquième heure d'expérience, le glycogène, coloré par le PAS, avait pratiquement disparu des cellules et que l'acide lactique était produit en quantité supérieure à celle des cellules-témoins.

Après cette activation initiale, la nystatine stoppe la consommation de l'oxygène et la glycolyse.

Nous avons découvert que l'iodoacétate et l'arséniate de sodium, ajoutés en présence de nystatine, accentue l'effet toxique ; il y a action synergique de la nystatine et de ces deux poisons de la glycolyse.

L'iodoacétate inhibe l'activité de l'aldolase de Fischer qui scinde la molécule d'hexose (le fructose 1-6 phosphate) en 2 trioses, le 3 phosphate-glycéraldéhyde et la 3 phosphodihydroxyacétone, et inversement. Il inhibe aussi la 3 phosphate-glycéraldéhyde déshydrogénase, qui permet l'oxydation du 3 phosphate glycéraldéhyde en acide diphosphoglycérique. Warburg et Christian (81) ont trouvé que l'arséniate peut remplacer le phosphate dans la phosphorylation de ce même substrat, mais que la réaction n'est pas réversible.

D'autre part, nous avons constaté que les cellules produisent de si grandes quantités de lipides que leur cytoplasme en regorge. Le glycérol est un des précurseurs de la synthèse des lipides. Or Oesper et Meyerhof (55) ont montré que si le 3 phosphate-glycéraldéhyde n'est pas utilisé, l'isomérase favorise la production de la 3 phosphodihydroxyacétone, laquelle peut alors oxyder le coenzyme I et former le glycérophosphate ; ce dernier peut être lui-même hydrolysé en glycérol par une phosphatase dont nous avons établi la grande activité.

Les acides gras peuvent se former à partir de l'acide lactique en excès [Paul et Pearson (58)]. Enfin la choline disparaît des cellules et ne peut donc pas s'opposer à l'accumulation des graisses [Best (4)].

Ces faits permettent de penser que la nystatine est toxique par le blocage de l'utilisation par les cellules du 3 phosphoglycéraldéhyde. Racker (66) et Krinsky et Racker (42) ont donné des réactions qui lui sont

associées, le schéma suivant :

Il y aurait formation d'un complexe de l'apoenzyme (déshydrogénase) avec le DPN par l'intermédiaire d'une liaison - S -. Cette enzyme, stable, oxyderait le glycéraldéhyde en régénérant la coenzyme sous forme réduite et en donnant naissance à un nouveau complexe (enzyme acylée), qui, par phosphorylation, libérerait les groupes SH et formerait l'acide 1-3 diphosphoglycérique.

La nystatine n'inhibe pas la formation de l'enzyme en privant la cellule de ses cofacteurs. En effet les groupes SH se présentent en excès (méthode histochimique) et l'addition de cystéine aggrave l'effet toxique de l'antibiotique. Le DPN, ajouté au milieu, ne modifie pas non plus l'action toxique.

Elle n'empêche pas non plus la phosphorylation de l'enzyme acylée, en privant les cellules d'ions phosphates ; car ajoutés au milieu, ils accélèrent également l'action toxique.

Il reste donc la possibilité d'une action de la nystatine au niveau de l'enzyme ou du substrat.

Le déshydrogénase oxyde le 3 phosphoglycéraldéhyde plus rapidement que n'importe quel autre substrat, mais peut réagir avec d'autre - Fruton et Simmonds (24) p. 326 -. La nystatine, renfermant dans sa molécule, un sucre aminé, la "mycosamine" [Walters et coll. (78)], forme peut-être avec l'enzyme un complexe qui bloquerait l'utilisation du glycéraldéhyde.

Une inhibition de la glycolyse par la compétition de la nystatine avec le 3 phosphoglycéraldéhyde pour l'enzyme, pourrait se faire. Dans ce cas, toute variation de concentration des substrats, devra modifier les courbes. S'il n'y a pas de compétition, les courbes resteront les mêmes. Or nous avons obtenu une protection contre l'effet toxique de la nystatine variable avec les concentrations.

Si la nystatine bloque la glycolyse au niveau du 3 phosphoglycéraldéhyde, l'ATP n'est plus régénéré. En effet l'acide 1-3 diphosphoglycérique est transformé en acide 3 phosphoglycérique, parallèlement à la phosphory-

lation de l'ADP. Si l'ATP n'est plus synthétisé l'intégrité des mitochondries n'est plus maintenue et le transfert des électrons n'est plus assuré.

Le même effet protecteur de ce substrat contre l'action toxique de l'amphotéricine a été observé.

A ce mode d'action toxique sur les cellules animales, lié à leur structure chimique proche (56), s'ajoute une certaine similarité d'action envers les cellules végétales.

En effet, quoique agissant à une concentration beaucoup plus faible sur les tissus végétaux, sur les levures (ce qui permet leur utilisation thérapeutique), les mêmes effets inhibiteurs de la respiration et du métabolisme glucidique ont été observés par Lampen et coll. (46) Bradley (5), Harman et Masterson (32) avec la nystatine, par Fujii (25) avec la trichomycine; par Drouhet (18) avec l'ascosine et les amphotéricines.

Il faut noter cependant certaines différences entre les manifestations toxiques observées pour les cellules animales ou végétales. Ainsi Lampen et Bradley ont trouvé que l'addition de cystéine, de glucose, d'arséniate de sodium au milieu d'incubation, diminuait l'effet toxique de la nystatine sur *Candida stellatoïdea*. Nous avons trouvé que ces produits, au contraire, aggravent cet effet toxique sur les cellules "HeLa".

Lampen et coll. ont noté que la stimulation de la respiration se produisait aux concentrations élevées de nystatine. Nous avons trouvé, comme Drouhet et coll. pour l'amphotéricine B, que cet effet stimulant est nul aux fortes concentrations.

D'autre part Osteux et coll. (57), en étudiant le métabolisme du phosphore marqué chez les levures mises en présence de nystatine, ont mesuré une perte considérable de dérivés phosphorylés et de facteurs essentiels à la croissance. Ils en concluent que l'action toxique de la nystatine serait due à une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire. Nous avons noté aussi une perte de la basophilie du cytoplasme, du glycogène, des ribonucléoprotéines. Mais il semble qu'une action sur la perméabilité de la membrane cellule. ne

suffise pas à expliquer les phénomènes que nous avons observés.

Scholz et coll. (70) ont trouvé pour les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, une élévation du taux d'hexoses et de trioses phosphorylés ainsi que la perte d'activité enzymatique *in vivo*. Ceci concorde avec nos résultats. Cependant ces auteurs attribuent la perte d'activité enzymatique, observée *in vivo*, à la protéolyse des cellules.

Harman et Masterson (32) ont dit que la toxicité de la nystatine serait due à la formation de polymétaphosphates qui bloquerait ainsi la réserve d'énergie des cellules (*Candida*). Nous avons aussi trouvé une inhibition des oxydations cellulaires.

Il semble donc que les cellules animales et végétales répondent par des phénomènes similaires à la toxicité de la nystatine et de l'amphotéricine B, antibiotiques du groupe des polyènes.

VIII - CONCLUSIONS GENERALES

Si des progrès rapides sont réalisés dans le domaine des cultures cellulaires *in vitro*, c'est en grande partie grâce à l'introduction des antibiotiques dans les milieux de culture, où peuvent être maintenues des conditions stériles de travail.

La pénicilline, la streptomycine sont couramment utilisées et assurent une assez bonne protection contre la contamination bactérienne.

Nous avons recherché quels sont les produits les meilleurs pour lutter contre l'action des champignons.

I - EVALUATION DES PRODUITS ANTIFONGIQUES

Nous avons évalué ces produits en déterminant leur activité à l'égard de différentes espèces de champignons, et leur toxicité pour différentes couches de cellules animales.

La nystatine à la dose de 25 mcg. par ml, et l'amphotéricine A ou B, à la dose de 40 mcg. par ml, se sont manifestés comme étant les agents les plus efficaces en vue d'une utilisation générale dans la culture cellulaire. Dans le cas de souches résistantes à ces antibiotiques, on peut utiliser la pléocidine, fongicide pour les levures à la dose de 7 mcg./ml., et l'eulicine, fongicide pour les moisissures à la dose de 10 mcg./ml.

De plus nous avons pu établir, qu'au-delà d'une concentration de 120 mcg. par ml de nystatine et de 200 mcg. par ml d'amphotéricine A, il était possible de déterminer l'existence d'un effet toxique pour les cellules animales. C'est ce mode d'action toxique que nous avons étudié.

II - EFFET TOXIQUE DE LA NYSTATINE SUR LES CELLULES ANIMALES

Ayant remarqué que la concentration critique de toxicité pouvait varier d'un lot à l'autre, nous avons vérifié si la toxicité n'était pas due à une impureté associée à la nystatine. Le spectre en ultra violet des différentes solutions est demeuré inchangé. Nous n'avons pas pu, en réalisant des chromatographies sur colonne, séparer des fractions d'activité différente.

Nous avons alors tenté de découvrir si l'effet toxique de la nystatine se manifeste par une action externe ou interne.

Une action externe est peu probable : en effet, le pH acide des suspensions de nystatine est tamponné par les milieux de culture ; la morphologie des cellules, restant intacte pendant les premières 20 heures de contact, exclut la possibilité d'une action sur la pression osmotique ; enfin, la nystatine ne forme pas de complexe avec un élément nutritif du milieu, dont les cellules seraient alors privées, car l'effet toxique n'est pas réversible.

Nous avons, en effet, établi que cet antibiotique pénètre dans les cellules, qu'il s'y fixe et qu'il doit interférer avec quelque processus métabolique sans que son activité en soit changée.

Les courbes de croissance cellulaire, établies par numération des cellules, les courbes de respiration cellulaire, faites d'après les mesures obtenues grâce à l'appareil de Warburg, et les dosages de glucose et d'acide lactique, présents dans les surnageants, ont permis de conclure au mode d'action toxique suivant :

La nystatine pénètre dans les cellules, en stimule la glycolyse pour l'inhiber ensuite, et cela d'autant plus tôt que la concentration est plus grande. Aux concentrations moins toxiques, il y a également stimulation de la respiration et cette stimulation est stoppée ensuite d'autant plus rapidement que la concentration d'antibiotique est plus forte.

Enfin nous avons suivi cet effet toxique sur lamel-

les colorées. Les cellules se vacuolisent. les nucléoles ont tendance à s'arrondir et à devenir uniques. Puis le cytoplasme est désorganisé, perd sa basophilie ; enfin, les cellules sont pycnotiques et se détachent du verre. les mitoses sont normales.

Le mécanisme de cette action sur le métabolisme glucidique et respiratoire, a été alors étudié.

III - ACTION DE LA NYSTATINE SUR LE METABOLISME DES GLUCIDES

Pour étudier ce phénomène complexe, nous avons eu recours à des méthodes histochimiques et à l'emploi dans nos milieux de culture de différents poisons, substrats et cofacteurs de la glycolyse.

Toute synthèse de protéine, constituant un processus endergonique, puise son énergie dans des réactions exergoniques, le plus souvent des réactions d'oxydation. Le glucose est la source d'énergie la plus fréquemment utilisée. Une inhibition de l'utilisation du glucose entraîne forcément un arrêt de la synthèse de protéine, suivie de la mort des cellules. Nous avons, en effet, remarqué que les ribonucléoprotéines, colorées par la pyronine ou le bleu de toluidine, disparaissent graduellement du cytoplasme.

1) Similitude d'action de la nystatine et du 2,4 dinitrophénol.

L'analogie des courbes de respiration cellulaire en présence de nystatine et de 2,4 dinitrophénol, fait entrevoir la possibilité d'un mode d'action semblable dans les 2 cas. Si, de même que le dinitrophénol, la nystatine provoque une stimulation de l'activité de l'ATPase, elle doit modifier en même temps les réactions qui en dépendent.

Nous avons bien constaté une augmentation de cette phosphatase alcaline ; mais la méthode de Gomori localise cette activité au niveau de la membrane cellulaire. Il est d'ailleurs difficile en l'état actuel des recher-

ches histochimiques, de localiser les différentes phosphatases.

Nous avons noté une action au niveau des nucléoles qui s'arrondissent et deviennent uniques. Yoshida et Pomerat ont remarqué qu'une forte concentration d'ATP produit ce changement de morphologie.

L'activité de la succino déshydrogénase est également liée aux réactions d'oxydo-réduction ; fortement stimulée pendant les premières heures de contact avec la nystatine, elle disparaît au moment où la respiration est inhibée.

De plus l'ATPase hydrolyse l'ATP en ADP et acide phosphorique qui vont se trouver en excès. Or d'une part, nous avons remarqué que l'addition d'ADP au milieu de culture, stimule la respiration des cellules normales ; d'autre part les ions phosphates permettent la phosphorylation du glycogène des cellules et du glucose du milieu.

Une stimulation de l'activité de l'ATPase peut donc expliquer en partie l'activation de l'assimilation du glucose et sa dégradation. Nous avons d'ailleurs constaté, que le glycogène, coloré par le PAS, avait disparu dès la 5ème heure d'expérience et que l'acide lactique était produit en quantité supérieure à celle des cellules-témoins.

2) Réactions de blocage de la glycolyse au niveau du 3 phosphoglycéraldéhyde.

Nous avons découvert qu'il y a action synergique de la nystatine et des deux poisons de la glycolyse, l'iodoacétate et l'arséniate de sodium.

L'iodoacétate inhibe l'activité de l'aldolase qui scinde le fructose 1-6 phosphate en 2 trioses, le 3 phosphate glycéraldéhyde et la 3 phosphodihydroxyacétone et inversement. Il inhibe aussi la 3 phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase, qui permet l'oxydation du 3 phosphoglycéraldéhyde.

L'arséniate remplace irréversiblement le phosphate dans la phosphorylation de ce substrat en acide 1-3 diphosphoglycérique.

Nous avons constaté d'autre part que les cellules en présence de nystatine, produisent des lipides en si grande quantité que le cytoplasme en regorge. Le glycérol est un des précurseurs de la synthèse des lipides. Or si le glycéraldéhyde n'est pas utilisé, l'isomérase favorise la production de la dihydroxyacétone, laquelle peut alors oxyder le DPN et former le glycérophosphate ; ce dernier peut être lui-même hydrolysé en glycérol par une phosphatase. Nous avons montré par des procédés histo-chimiques, l'existence d'une forte augmentation d'activité des phosphatases. Les acides gras peuvent se former par incorporation de l'acide lactique, présent en excès.

Ces faits permettent de penser que la nystatine est toxique par le blocage de l'utilisation par les cellules du 3 phosphoglycéraldéhyde. Cette action peut s'exercer soit au niveau de l'enzyme, soit au niveau du substrat.

La nystatine ne prive pas l'apoenzyme de ses cofacteurs. En effet le DPN, ajouté au milieu, ne modifie pas l'effet toxique. Les groupes SH, se trouvent en excès dans les cellules (ce que nous avons mis en évidence par la méthode histo-chimique) et l'addition de cystéine aggrave l'effet toxique de l'antibiotique.

Elle n'empêche pas non plus la phosphorylation de l'enzyme acylée, en privant les cellules d'ions phosphates : car ceux-ci, ajoutés au milieu, accélèrent également l'action toxique.

Une inhibition de la glycolyse par compétition de la nystatine avec le 3 phosphoglycéraldéhyde est probable. Ce substrat, suivant les concentrations utilisées, protège les cellules contre l'effet toxique de la nystatine. S'il n'y avait pas compétition pour la déshydrogénase, l'action toxique de la nystatine se manifesterait de la même façon quelles que soient les concentrations utilisées.

Cette inhibition permettrait d'expliquer également l'arrêt des oxydations cellulaires. L'ATP ne serait plus régénéré, car la déphosphorylation de l'acide 1-3 phosphoglycérique se fait parallèlement à la phosphorylation de l'ADP. Si l'ATP n'est plus synthétisé, l'in-

tégrité des mitochondries n'est plus maintenue et le transfert des électrons n'est plus assuré.

IV - CONCLUSION

Nous avons observé l'effet d'abord stimulant, puis inhibiteur de la respiration et de la glycolyse sur les cellules animales avec un autre antifongique du groupe des polyènes, l'amphotéricine B.

De nombreux auteurs ont observé le même phénomène en étudiant l'action des antibiotiques de ce groupe sur les tissus végétaux et les levures : l'ascosine, la nystatine, les amphotéricines A et B, la trichomycine.

Il semble donc que ces antibiotiques qui se caractérisent par une structure de polyène à doubles liaisons conjuguées, soient toxiques pour les cellules animales et végétales en agissant sur le métabolisme des glucides.

Nous avons vu que l'addition simultanée de la nystatine et d'un substrat de la glycolyse, le 3 phosphoglycéraldéhyde, empêche l'action toxique de la nystatine.

Il demeure possible que l'action toxique des autres antibiotiques se produise au même stade de la glycolyse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson N.G., 1953, Mass isolation of whole cells from rat liver, *Sci.*, **117**, p. 627-628.
2. Barker S.B. et Summerson W.H., 1941, The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* **138**, p. 535-554.
3. Beck W., 1958, The control of leucocyte glycolysis, *J. Biol. Chem.*, **232**, p. 251-283.
4. Best C.H., 1950, Protection of liver and kidneys by dietary factors - choline and its precursors as lipotropic agents, *Fed. Proc.*, **9**, p. 506-511.
5. Bradley S.G., 1958, Interactions between phosphate and nystatin in *Candida stellatoidea*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, p. 786-789.
6. Brian P.W. et Mc Gowan J.R., 1945, Viridin : a highly fungistatic substance produced by *Trichoderma Viride*, *Nature*, **156**, p. 144.
7. Brian P.W. et Mc Gowan J.R., 1949, Studies on the Biological activity of griseofulvin, *Ann. Bot.*, **13**, p. 60-77.
8. Burk D. and Schade A.L. 1956, On respiratory impairment in cancer cells, *Sci.*, **124**, p. 270-271.
9. Burstone M.S., 1959, New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase), *J. Histochem. and Cytochem.*, **7**, p. 112-122.
10. Cavallito C.J. and Bailey J.H., 1944, Preliminary note on the inactivation of antibiotics, *Sci.*, **100**, p. 390.
11. Charney J., Machlowitz R.A., Mc Carthy F.J., Rutkowski G.A., Tyttel A.A. and Fischer W.P., 1955-1956, Eulicin, a new antifungal agent, *Antibiotics Annuals*, p. 228-230.

12. Charney J. Roberts W. and Fischer W.P., 1952, Pleodidine a new antibiotic related to streptothricin, *Antibiotics and Chemotherapy*, 2, p. 307-310
13. Cori G.T., Slein M.W., Cori C.F., 1948, Crystalline D - Glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase from rabbit muscle., *J. Biol. Chem.*, 173, p. 605-618.
14. Danes B, Christiansen G.S., Leinfelder P.J., 1953, A cartesian diver balance capillary respirometer for metabolic studies in tissue cultures, *Exp. Cell. Res.*, 5, p. 234-247.
15. Delsal J.L., Communication personnelle.
16. Drouhet E., 1957, Antifongiques et Thérapeutique des mycoses, *Sem. des Hôpitaux* (Paris), 33, p. 843-866.
17. Drouhet E., Hirth L. et Lebeurier G., 1960, Mode d'action des antibiotiques antifongiques. I. Action de l'amphotéricine B sur le métabolisme respiratoire de *Candida albicans*, *Ann. Inst. Pasteur*, 98, p. 469-484.
18. Drouhet E. Hirth L. et Lebeurier G., 1960, Some aspects of the mode of action of polyene antifungal antibiotics, *Ann. N.Y. Acad. of Sci.*, 89, p. 134-155.
19. Dulbecco R. and Vogt N. 1954, Plaque formation and isolation of pure line of polio-virus. *J. Exp. Med.*, 99, p. 167-182.
20. Dutcher J.D., Boyack G. and Fox.S., 1953-1954, The preparation and properties of cristalline fungicidin (nystatin), *Antib. Ann.*, p. 191-194.
21. Dutcher J.B., Walters D.R. et Wintersteiner O.P., 1955, Studies of chemical properties and structure of nystatin (mycostatin) - Therapy of Fungus Diseases An international symposium, edited by Sternberg.
22. Eagle H., 1955, The specific amino-acid requirements of a human carcinoma cell (HeLa strain) in tissue culture, *J. Exp. Med.*, 102, p. 37-48.
23. Earle W.R., 1943-1944, Production of malignancy in vitro - IV The mouse fibroblasts cultures and changes seen in the living cells, *J. Nat. Cancer Inst.*, 4, p. 165-213.

24. Fruton J.S. and Simmonds S., 1959, General Biochemistry, 2nd. edition, J. Wiley and Sons, Inc. (USA) editor.
25. Fujii T., 1957, Biochemical studies on pathogenic fungi - VIII. The effect of an antibiotic, Trichomycin, on the respiration and phosphorus metabolism of *Trichophyton gyseum*, *Pharmacol. Bull. Japan*, **5**, p. 511-514.
26. Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T., 1952, Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, *Canc. Res.*, **12**, p. 264-265.
27. Gold W., Stout H.A., Pagano J. and Donovan R., 1955-1956, Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomycete, *Antib. Ann.*, p. 579-586.
28. Green M. Henle G., Deinhardt F., 1958, Respiration and glycolysis of human cells grown in tissue culture, *Virology*, **5**, p. 209-219.
29. Gropp A., 1959, Vergleichende enzymhistochemische Beobachtungen zum Phosphatasenachweis an einigen Carcinomzellstämmen *in vitro* sowie über milieubedingte Veränderungen der Enzymaktivität, *Zeitschrift für Krebsforschung*, **63**, p. 156-167.
30. Gropp A., Bontke E. and Hupe K., 1958, Untersuchungen zum Nachweis der alkalischen Phosphatase an *in vitro* gezüchteten menschlichen Carcinomzellen mit besonderer, Berücksichtigung ihrer Beziehung zu der Zelloberfläche, *Exp. Cell. Res.*, **15**, p. 200-213.
31. Gurr E., 1958, Methods of analytical histology and histochemistry, Leonard Hill (Books) ltd. London.
32. Harman J.W. and Masterson J.G., 1957, Mechanism of nystatin action, *Irish J. Med. Sci.*, **378**, p. 249-253.
33. Hazen E.L. et Brown R., 1951, Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**, p. 93-97.

34. Hemphill J.J., Herman Y.F. and Young V.M., 1957-1958, Comparative antifungal activity of nystatin and amphotericin B in tissue culture for virus propagation, *Antib. Ann.*, p. 961-966.
35. Heilman D.H., 1945, Cytotoxicity of streptomycin and streptothricin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 60, p. 365-367.
36. Hernandez D.M., de la Fuente, Sanchez G. et Santes-Ruiz A., 1956, Estudios sobre carboxilasas, IX. Inhibicion enzimatica de la carboxilasa piruvica por los antibioticos del grupo glucidico, *Rev. Esp. de Fisiol.*, 12, p. 117-128.
37. Hernandez D.M., de la Fuente, Sanchez G. et Santes-Ruiz A., 1956, Estudios sobre carboxilasas, X. Inhibicion enzimatica de la carboxilasa piruvica por antibioticos de naturalesa protidica. *Rev. Esp. de Fisiol.*, 12, p. 143-152.
38. Herrel W.E. and Heilman D.H., 1943, Tissue cultures studies on cytotoxicity of bacterial agents. *Ann. J. Med.*, 205, p. 157-160.
39. Hunt W.H., 1955, Toxicity studies on amphotericin B., Report of the Squibb Institute for Medical Research, non published.
40. Karel Leonard's Dictionary of antibiotics, 1954, Columbia University Press.
41. King West M, Verwey W.F. et Miller K, 1955-1956, The biological activity of eulicin, *Antib. Ann.*, p. 231-235.
42. Krimsky I. and Racker E., 1955, Acyl derivatives of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, *Science*, 122, p. 319-321.
43. Lampen J.O., Morgan E.R. and Slocum A.C., 1957, Effect of nystatin on utilization of substrates by yeast and other fungi, *J. Bact.*, 74, p. 297-302.
44. Lampen J. and Arnow P., 1959, Significance of nystatin uptake for its antifungal action, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101, p. 792-797.

45. Lampen J.O., Morgan E.R., Slocum A., Arnow P., 1959, Absorption of nystatin by microorganisms, *J. Bact.*, **78**, p. 282-289.
46. Lampen J.O., Morgan E.R. and Slocum A.C., 1956, Inhibition of sugar utilization by nystatin, *Fed. Proc.* **15**, p. 295-296.
47. Landing B.H. Uzman L.L. and Whipple A., 1952, Phosphomolybdic acid as a staining reagent for lipids., *Lab. Invest.*, **1**, p. 456-472.
48. Laszlo J., Stengle J., Wight K. et Burk D., 1958, Effects of chemotherapeutic agents on metabolism of human acute leukemia cells *in vitro*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**, p. 127-131.
49. Lépine P., Slizewicz P., Daniel P. et Paccaud M., 1956, Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés, *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, p. 654-656.
50. Lévine C. et Chargaff E., 1951, Procedures for the microestimation of N^2 phosphatides constituents, *J. Biol. Chem.*, **192**, p. 465-479.
51. Lison L. 1960, Histochimie et Cytochimie animales, principes et méthodes, Gauthiers Villars éditeur, Paris, 3ème édition.
52. Love R. Orsi V.R. and Berry E.E., 1955, A simple stain for mitochondria, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, p. 666-669.
53. Love R. and Sharpless G., 1954, Studies on a transplantable chicken tumor RPL-12 Lymphoma - III. Cytological changes in oncolysis of a chicken tumor, *Cancer Res.*, **14**, p. 758-767.
54. Mc Limans Wm., Bonissol C., Davis E. and Rake G., 1955-1956, Nystatin, an antibiotic useful for the control of fungal and yeast contaminants, *Antib. Ann.*, p. 690-696.
55. Oesper P. et Meyerhof O., 1950, The determination of Triose phosphate isomerase. *Arch. Biochem.*, **27**, p. 223-233.

56. Oroshnik W., Vining L.C., Mebane A.D., Taber W.A., 1955, Polyene antibiotics, *Science*, **121**, p. 147-149.
57. Osteux R., Tran-Van-Ky, Biguet J., 1958, Contribution à l'étude du mode d'action de la nystatine sur *Candida albicans*, *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, **247**, p. 2475-2478.
58. Paul J. and Pearson E.S., 1957, Metabolism of chick embryonic heart explants during transition from *in vivo* to *in vitro* conditions, *Exp. Cell Res.*, **12**, p. 212-222.
59. Pearse A.G.E., 1960, Histochemistry, Theoretical and applied, J. and A. Churchill, Ltd. London, 2nd edition.
60. Peterson E.A. and Sober H.A., 1956, Chromatography of proteins, I. Cellulose Ion Exchange Adsorbents, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, p. 751-756.
61. Phillips H.J. and Feldhaus R.J., 1956, Respiration and Glycolysis of Earle's strain L cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**, p. 478-480.
62. Phillips H.J. and Mc Carthy H.L., 1956, Oxygen uptake and lactate formation of HeLa cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **93**, p. 573-576.
63. Phillips H.J. and Terryberry J.E., 1957, Counting actively metabolizing tissue cultured cells, *Exp. Cell. Res.*, **13**, p. 341-347.
64. Plantefol L., 1935, Les levures et le dinitrophénol, 1, 2, 4, *Ann. des Fermentations*, **1**, p. 149-162.
65. Prop F.J.A., 1954, A microrespirometer for simultaneous measurements of O_2 consumption and CO_2 production and its use in determining the respiratory quotient of tissue cultures, *Exp. Cell. Res.*, **7**, p. 303-317.
66. Racker E., 1955, Mechanism of action and properties of pyridine nucleotide linked enzymes, *Physiol. Rev.*, **35**, p. 1-56.

67. Rothstein A. and Berke H., 1952, Effects of 2,4, di-nitrophenol concentrations, on rates of respiration and fermentation of yeast, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**, p. 559-563.
68. Rutenburg A.M., Gofstein R., Seligman A.M., 1950, Preparation of a new tetrazolium salt which yields a blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues, *Canc. Res.*, **10**, p. 113-121.
69. Scherer W.F., Syverton J.T. and Gey G.O., 1953, Studies on propagation *in vitro* of polio virus, *J. Exp. Med.*, **97**, p. 695-710.
70. Scholz R., Schmitz H., Bucher T, Lampen J.O., 1959, Über die Wirkung von Nystatin auf Bäckerhefe, *Biochem. Z.*, **331**, p. 71-86.
71. Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E., 1950, The estimation of glycogen with the anthrone reagent., *Arch. Biochem.*, **25**, p. 191-200.
72. Seligman A.M. and Rutenburg A.M., 1951, The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase, *Science*, **113**, p. 317-320.
73. Umbreit W.W., Burris R.H. and Stauffer J.F., 1951, Manometric Technique and tissue metabolism, Burgess Publishing Co., Minneapolis Minn., U.S.A.
74. Vandeputte J., Wachtel J.L., Stiller E.T., 1955-1956, Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomycete - II, the isolation and properties of the crystalline Amphotericins, *Antib. Ann.*, p. 587-591.
75. Vorbrodt A., 1957, The effect of some inhibitors of oxidative phosphorylation on the histochemically demonstrable phosphatases, *Exp. Cell Res.*, **12**, p. 154-162.
76. Wachstein M. and Meisel E., 1957, Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH. *Am. J. of Clin. Path.*, **27**, p. 13-23.

77. Walker A.T. and Smith F.G., 1952, Effect of actidione on *Myrothecium verrucaria*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**, p. 556-559.
78. Walters D.R., Dutcher J.D., Wintersteiner O., 1957, Structure of mycosamine, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, p. 5076-5077.
79. Warburg O., 1956, On the origin of cancer cells, *Science*, **123**, p. 309-314.
80. Warburg O. und Christian W., 1932, Über ein neues Oxydations ferment und sein Absorptionsspektrum, *Biochem. Z.*, **254**, p. 438-458.
81. Warburg O. und Christian W., 1939, Isolierung und Kristallisation des Proteins des Oxydierenden Gärungsferments, *Biochem. Z.*, **303**, p. 40-68.
82. Wenner C.F. and Weinhouse S., 1956, Metabolism of neoplastic tissue - IX, An isotope tracer study of glucose catabolism path ways in normal and neoplastic tissues, *J. Biol. Chem.*, **222**, p. 399-414.
83. Yoshida M. and Pomerat C.M., 1960, Nucleolar changes in relation to ATP., 1er Congrès international d'histochimie et de cytochimie.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	5
I - MATERIEL ET METHODES	7
1. Cultures cellulaires	7
2. Produits antifongiques	7
3. Fongi	8
4. Titrage des agents antifongiques	8
5. Etudes à l'appareil de Warburg	9
6. Etudes des cellules au microscope	11
II - ACTIVITE ET TOXICITE DES PRODUITS ANTI-FONGIQUES	12
A - Définition de l'activité et de la toxicité	12
B - Valeur comparée des différents produits	12
C - Conclusions	15
III - EFFET TOXIQUE DE LA NYSTATINE SUR LES CELLULES ANIMALES	17
A - Etude du spectre de la nystatine en ultraviolet	18
B - Action externe	19
1. Action sur le pH	20
2. Action sur la pression osmotique des cellules	20
3. Action par la formation de complexes avec les éléments nutritifs du milieu	20

	Pages
C - Action interne	22
1. Simple accumulation de l'antibio- tique dans les cellules	22
2. Formation de complexes intracel- lulaires	24
a) courbes de croissance par numé- ration cellulaire	24
b) mesure de la respiration des cellules	25
c) facteurs d'inhibition de l'ef- fet toxique	26
d) coloration des cellules faite en relation avec les courbes de croissance	27
e) dosage du glucose et de l'acide lactique dans les milieux de culture	29
D - Résultats	31
 IV - METHODES HISTOCHIMIQUES	 32
1. Les désoxyribonucléoprotéines	33
2. Les ribonucléoprotéines	34
3. Le chondriome	35
4. Les polysaccharides	36
a) les polysaccharides	36
b) le glycogène	37
5. Les groupes sulfhydryles	38
6. Les graisses neutres	38
7. Les phospholipides	39
a) coloration générale	39
b) lipides non saturés	40
c) produits d'hydrolyse	40
d) le plasmalogène	40
e) la réaction à l'acide phospho- molybdique	41
8. Les phosphatases alcalines	42
9. Les phosphatases acides	43
10. La cytochrome oxydase	44
11. Les déshydrogénases	45

	Pages
V - ACTION DE LA NYSTATINE SUR LE METABOLISME DES GLUCIDES	48
A - Action parallèle de certains poisons.....	48
1. Le 2,4 dinitrophénol.....	48
2. L'arséniate de sodium.....	50
3. Le fluorure de sodium.....	51
4. L'acide iodoacétique.....	51
B - Addition des substrats de la glycolyse	52
1. Le glucose.....	52
2. Le pyruvate.....	52
3. Les acides organiques du cycle de Krebs.....	53
4. Le 3 phosphoglycéraldéhyde.....	53
5. L'acide phosphoglycérique.....	54
C - Addition des cofacteurs de la glyco- lyse.....	54
1. Le pyridoxal phosphate.....	54
2. La riboflavine.....	55
3. L'ATP et l'ADP.....	55
4. Les phosphates.....	55
5. La cystéine.....	56
6. La cozymase I.....	56
7. La coenzyme A.....	57
8. La cocarboxylase.....	57
9. La 3 phosphoglycéraldéhyde déshy- drogénase.....	57
 VI - ACTION DE L'AMPHOTERICINE B SUR LES CEL- LULES ANIMALES	 58
1. Morphologie des cellules cultivées en présence d'amphotéricine B.....	58
2. Métabolisme respiratoire et gluci- dique.....	59

	Pages
3. Action du 3 phosphoglycéraldéhyde sur l'effet toxique de l'ampho- téricine B	60
VII - DISCUSSION	61
VIII - CONCLUSIONS GENERALES	67

*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

“ INFECTIONS LATENTES A VIRUS ”

Vu et approuvé :

Paris, le 2 Juin 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'Imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean SARRAILH

